

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 39/00, 39/02, 39/106, 39/39 //</b> <b>C12N 9/80, 15/57</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/31235</b> (43) Date de publication internationale: 10 octobre 1996 (10.10.96)
(21) Numéro de la demande internationale: <b>PCT/FR96/00534</b> (22) Date de dépôt international: <b>9 avril 1996 (09.04.96)</b> (30) Données relatives à la priorité: <b>95/04433 7 avril 1995 (07.04.95) FR</b> (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): <b>PASTEUR-MERIEUX SERUMS &amp; VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).</b> (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): <b>GUY, Bruno [FR/FR]; 15 B, rue des Noyers, F-69005 Lyon (FR). HAENSLER, Jean [FR/FR]; 17, rue Piccandet, F-69290 Saint-Genis-les-Ollières (FR). QUENTIN-MILLET, Marie-José [FR/FR]; 70, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR).</b> (74) Mandataire: <b>AYROLES, Marie-Pauline; Pasteur-Mérieux Sérums &amp; Vaccins, Dépt. Propriété Industrielle, Boîte postale 7046, F-69348 Lyon Cédex 07 (FR).</b>		(81) Etats désignés: <b>AU, CA, CN, HU, JP, MX, NO, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: <b>COMPOSITION FOR INDUCING A MUCOSAL IMMUNE RESPONSE</b> (54) Titre: <b>COMPOSITION DESTINEE A L'INDUCTION D'UNE REPONSE IMMUNITAIRE MUCOSALE</b> (57) Abstract <p>A pharmaceutical composition is disclosed for inducing a protective immune response to an antigen in a mucosal effector site in a host mammal. The composition includes at least two identical or different components each containing an immune response inducing agent selected from the antigen, with the proviso that the antigen is a protein antigen, and an expression cassette capable of expressing the antigen, for concurrent or consecutive administration. One of the components is formulated for nasal/oral delivery so that the inducing agent is targeted to the immune response inducing site(s) in the nose/oral cavity/pharynx or the salivary glands, whereas the other component is formulated for suitable mucosal delivery other than nasal delivery so that the inducing agent is targeted to the immune response inducing site(s) at the effector site where an immune response is desired. Said composition may optionally also include a third component that is identical to or different from the first two components and formulated for systemic administration.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet une composition pharmaceutique destinée à induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire protectrice à l'encontre d'un antigène, au niveau d'un site mucosal effecteur, qui comprend au moins deux produits identiques ou différents contenant chacun un agent inducteur de la réponse immunitaire sélectionné parmi l'antigène et à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène, pour une administration concomitante ou consécutive; l'un des produits étant formulé de manière à être administré par voie naso-buccale afin que l'agent inducteur soit ciblé vers le ou les site(s) inducteur(s) d'une réponse immunitaire au niveau du naso-oro-pharynx ou des glandes salivaires, l'autre produit étant formulé de manière à être administré par une voie mucosale appropriée autre que la voie nasale, afin que l'agent inducteur soit ciblé vers le ou les site(s) inducteur(s) d'une réponse immunitaire au niveau du site effecteur où la réponse immunitaire est recherchée. De manière optionnelle, une telle composition peut aussi comprendre un troisième produit, identique ou différent aux deux premiers, formulé pour être administré par voie systémique.</p>			

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

5 COMPOSITION DESTINEE A L'INDUCTION D'UNE REPONSE  
IMMUNITAIRE MUCOSALE

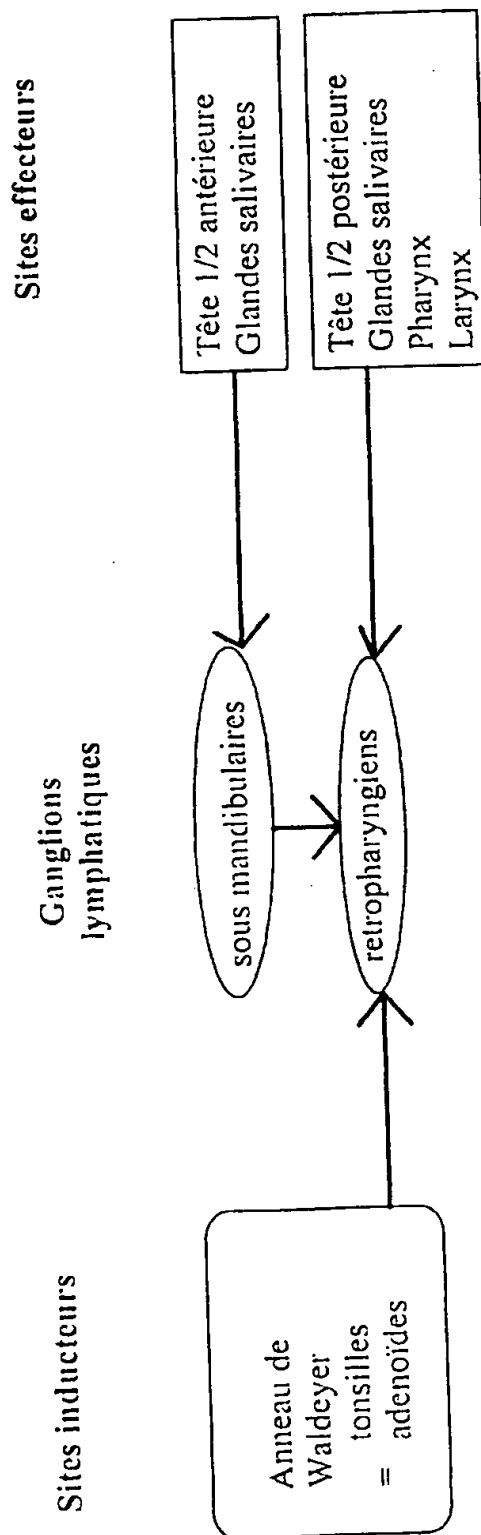
La présente invention a pour objet un kit de vaccination destiné à induire chez un mammifère, une réponse immunitaire protectrice à l'encontre d'un organisme pathogène infectant des muqueuses.

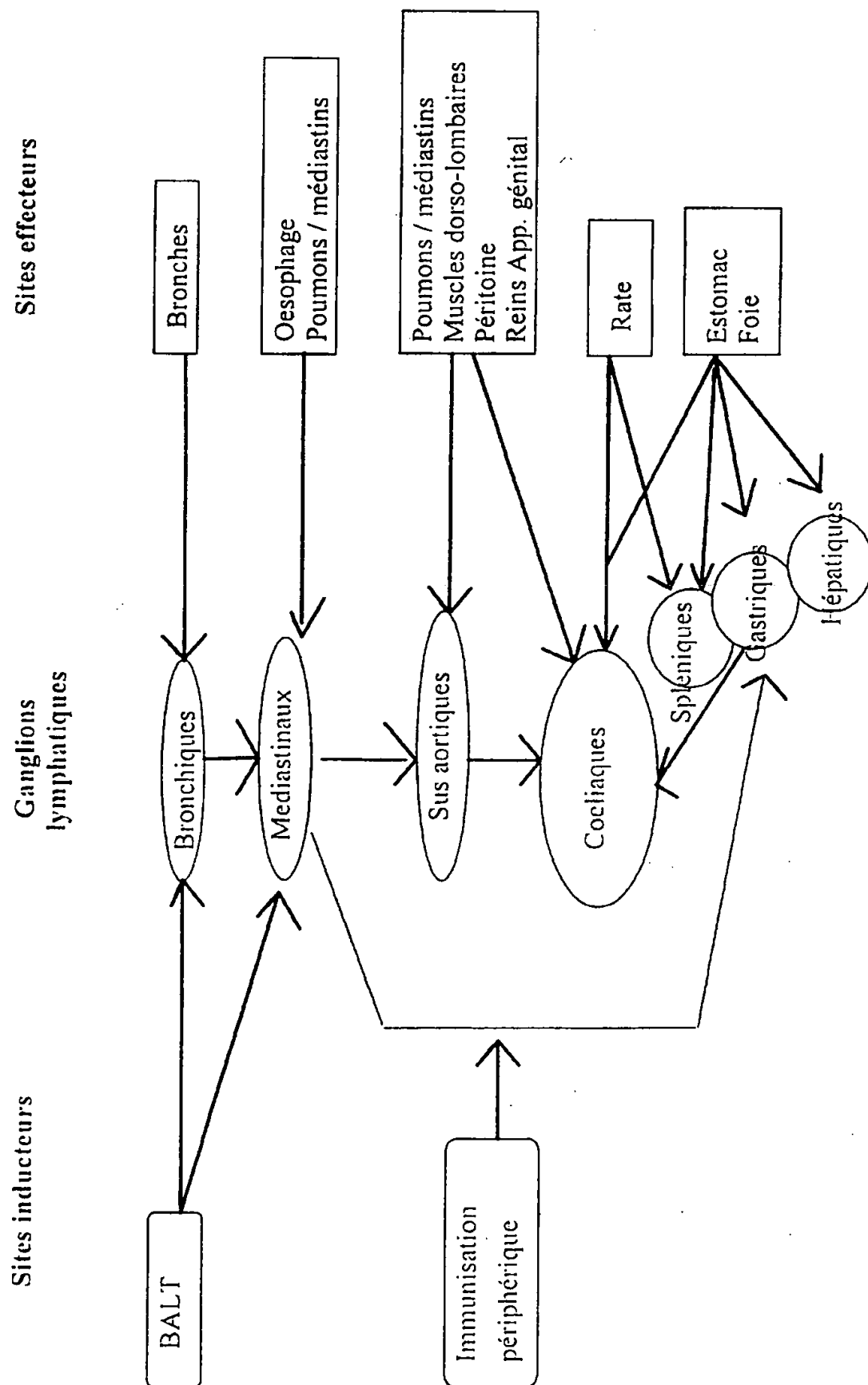
Les cellules de l'immunité peuvent être concentrées au sein d'organes ou former un tissu lymphoïde plus ou moins diffus, ces tissus et organes constituant dans leur ensemble le système lymphoïde. On distingue les organes lymphoïdes primaires qui sont les sites majeurs de la lymphopoïèse (thymus, moelle osseuse), et les organes et tissus lymphoïdes secondaires au sein desquels les lymphocytes peuvent interagir entre eux ou avec l'antigène. Les organes lymphoïdes secondaires comprennent la rate, les ganglions lymphatiques et les formations lymphoïdes associées aux muqueuses (MALT pour mucosal associated lymphoid tissue), plaques de Peyer et amygdales palatines entre autres. En plus du tissu lymphoïde organisé constituant le MALT, on trouve de nombreux lymphocytes dans la muqueuse de l'estomac, de l'intestin grêle, du colon, des bronches et de divers autres organes.

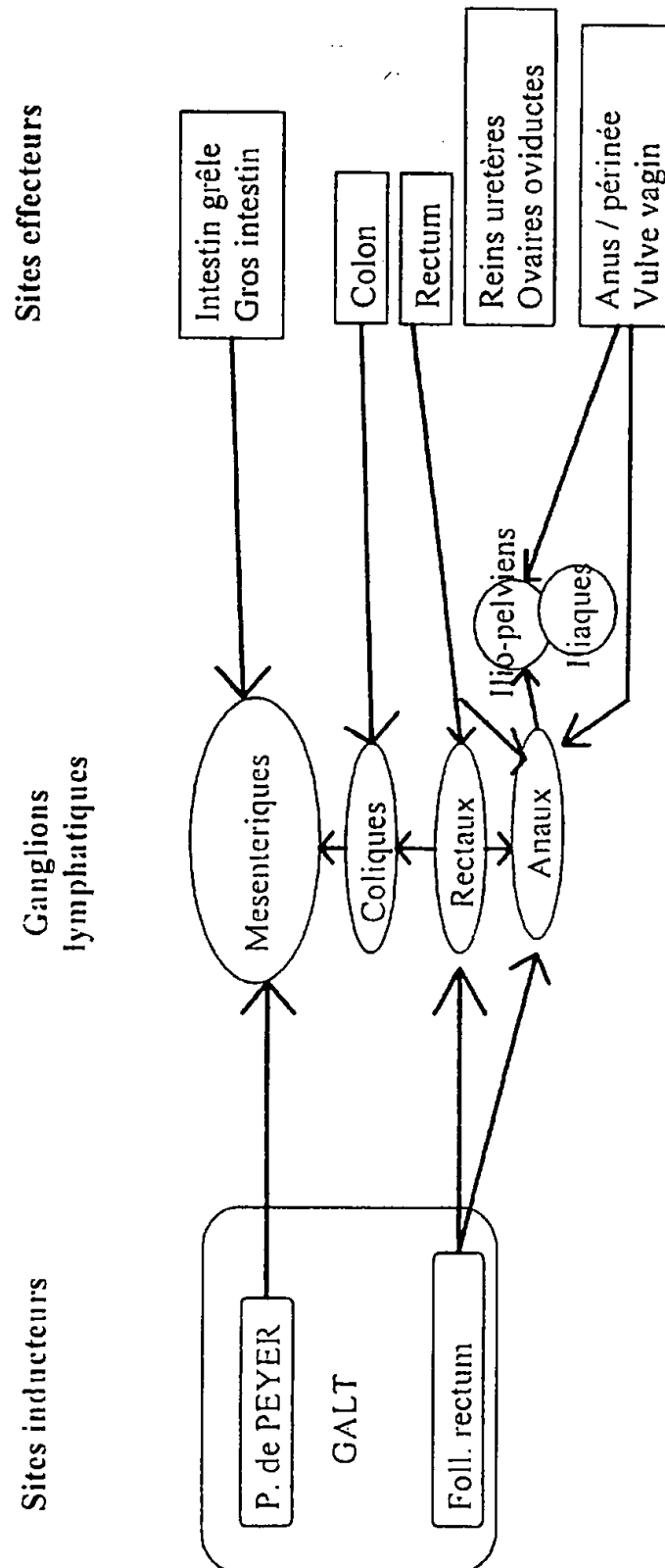
Après s'être différenciés dans les organes lymphoïdes primaires, les lymphocytes migrent dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces derniers peuvent être des sites inducteurs de l'immunité systémique ou de l'immunité mucosale. On peut ainsi les appeler organes "systémiques" ou "muqueux".

Parmi les organes "systémiques", on distingue la rate qui répond aux antigènes pénétrant dans la circulation sanguine, et les ganglions périphériques qui assurent la protection vis-à-vis des antigènes pénétrant dans la zone anatomique dont ils assurent le drainage lymphatique. Dans le tableau ci-après, on présente une liste des différents ganglions en liaison avec les zones qu'ils drainent (sites inducteurs ou effecteurs).

Le système immunitaire associé aux muqueuses, pour sa part, protège l'organisme contre les antigènes pénétrant par les surfaces épithéliales muqueuses et y résidant. On trouve l'anneau de Waldeyer et les tissus lymphoïdes associés au tractus respiratoire (BALT pour bronchial associated lymphoid tissue), au tube digestif (GALT pour gut associated lymphoid tissue) et au tractus uro-génital. Le système immunitaire associé aux muqueuses (sites inducteurs) est présenté dans le tableau ci-après :







- 5 Une fois stimulés dans les organes secondaires inducteurs, les lymphocytes peuvent migrer vers les sites effecteurs en transitant par la lymphe, via les ganglions associés aux sites inducteurs, éventuellement via les ganglions plus importants drainant ces premiers ganglions, les veinules lymphatiques efférentes aboutissant dans le canal thoracique. La lymphe de ce dernier rejoint la circulation sanguine par  
10 laquelle les cellules rejoignent les organes cibles ou sites effecteurs. En ce qui concerne les cellules lymphoïdes du MALT, celles-ci recirculent vers les territoires muqueux. Par exemple, des cellules stimulées dans les plaques de Peyer traversent les ganglions associés puis passent dans le sang pour venir se localiser dans certains sites muqueux. Cette recirculation sélective est due à la capacité des lymphocytes à  
15 reconnaître des molécules d'adhérence exprimées spécifiquement sur les cellules endothéliales des veinules post-capillaires des muqueuses. Grâce à ce mécanisme, la stimulation antigénique d'un territoire muqueux (inducteur) peut induire une réponse dans d'autres territoires muqueux (effecteurs).
- 20 A ce jour, de nombreuses méthodes d'immunisation ont été rapportées dans la littérature scientifique. Les caractéristiques-clé de ces méthodes sont, d'une manière générale, (i) la nature de l'immunogène, (ii) la ou les voies d'administration de l'immunogène ainsi que (iii) la formulation de l'immunogène.
- 25 En ce qui concerne la nature de l'immunogène, la possibilité d'utiliser en alternative à un antigène de nature protéique, un immunogène de nature nucléique (ARN, ADN) est déjà connue depuis longtemps. Il n'y a donc pas lieu de s'étendre plus avant.
- 30 Les voies et méthodes d'immunisation favorisant la prévention ou le traitement des infections mucosales ont déjà fait l'objet d'un certain nombre d'études sans pour cela être couronnées d'autant de succès que la vaccination à l'encontre des infections systémiques.
- 35 Néanmoins, l'ensemble de ces études indique que, lorsqu'il s'agit d'un pathogène s'implantant au niveau des muqueuses, la seule immunisation par voie systémique ne semble pas suffisante pour que se développe une protection convenable. Il semble souhaitable, sinon indispensable d'induire une immunisation par voie mucosale, éventuellement en surplus à une immunisation par voie  
40 systémique, pour lutter avec efficacité contre ce type d'infection. L'immunisation par voie mucosale permet essentiellement de stimuler le tissu lymphoïde drainant la ou



- 5 les muqueuses où se niche le pathogène et d'obtenir ainsi une réponse immunitaire ciblée au niveau de cette ou ces muqueuses.

Les immunoglobulines de type A (IgA) constituent la majorité des immunoglobulines à la surface des muqueuses gastro-intestinale, respiratoire, uro-  
10 génitale ou autres. Elles sont sécrétées au sein de ces muqueuses et réputées conférer une protection à l'encontre des infections affectant ces sites.

Une réponse immunitaire mucosale est usuellement obtenue après immunisation par voie mucosale, soit directement au niveau de la muqueuse  
15 effectrice, soit en un autre site mucosal éloigné du site où combattre l'infection. Les voies mucosales qui sont *a priori* accessibles pour immunisation sont la voie orale, la voie intragastrique, la voie nasale, la voie uro-génitale et la voie rectale. Toutefois, la voie orale est celle sur qui le choix se porte de préférence, en raison de sa facilité d'utilisation, que ce soit pour vacciner contre des infections de la muqueuse gastro-  
20 intestinale ou pour vacciner contre des infections affectant une autre muqueuse.

Pour illustrer ce propos, différents exemples de l'art antérieur sont donnés comme suit :

- 25 Récemment, Czinn et al. Vaccine (1993) 11 : 637 ont proposé l'ébauche d'une méthode de vaccination à l'encontre de *Helicobacter pylori*, agent pathogène de nombreux ulcères de l'estomac. Des souris axéniques ont reçu un sonicat d' *H. felis* adjuvé par la toxine cholérique, par voie intragastrique (sonicat directement administré, par intubation, au niveau de l'estomac). Après une épreuve par *H. felis*.  
30 on constate que les souris immunisées ont été protégées.

Cette procédure est par commodité, appelée dans la suite de l'article "immunisation orale". Cet article trouve son équivalent dans la demande de brevet Czinn & Nedrud WO 93/20 843.

35

Jertborn et al. Vaccine (1992) 10 : 130 relate une étude de vaccination anti-cholérique effectuée auprès d'un petit groupe de Suédois. Le vaccin était administré par deux fois, sous forme de solution liquide buvable. Ce vaccin s'est révélé à la fois efficace et sans risque.

40

5        La vaccination contre la grippe par voie nasale a été mise en oeuvre avec succès chez les enfants et les adultes, comme le rapporte Anderson et al, J. Clin. Microbiol. (1992) 30 : 2230 et Treanor et al, Ann. Inter. Med. (1992) 117 : 625.

10        Gallichan et al, J. Infect. Dis. (1993) 168 : 622 montre qu'il est possible d'induire à la fois une réponse immunitaire mucosale et systémique après administration par voie intranasale d'un adénovirus recombinant exprimant la glycoprotéine B de l'Herpes Simplex Virus (HSV). En conclusion, les auteurs suggèrent que d'une manière générale, leur approche permettrait d'obtenir une protection à long terme à l'encontre des virus transmis par voie mucosale ou sexuelle.

15        Certaines études telles que Forest et al, Vaccine (1990) 8 : 209, suggèrent que la voie rectale pourrait être une voie d'entrée commune à l'ensemble du système immunitaire mucosal et qu'il devrait être possible d'induire une réponse immunitaire mucosale en un site éloigné de la muqueuse rectale, utilisée comme voie d'entrée de l'immunogène.

20        L'association de différentes voies d'immunisation a déjà été décrite par plusieurs auteurs comme étant un moyen de choix pour obtenir une réponse optimale. L'association d'une voie mucosale et d'une voie systémique est par exemple décrite dans les articles suivants.

25        Keren et al, Infect. Immun. (1988) 56 (4) : 910 indique qu'une méthode d'immunisation par voies combinées, parentérale et orale, donne de meilleurs résultats en termes de réponse IgA à l'encontre de *Shigella flexneri*, qu'une immunisation par voie unique. En pratique, des souris reçoivent l'antigène par voie intramusculaire et par voie intragastrique à l'aide d'un tube, sous anesthésie.

30        Yoshimura et al, Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. (1991) 117 : 889 propose de vacciner contre les otites à pneumocoques en associant l'administration par voies systémique et orale. Les protocoles d'immunisation sont testés chez le cobaye. L'administration dite par voie orale, s'effectue en fait au niveau du duodénum ou de l'estomac au moyen d'un cathéter ou bien consiste en l'absorption de capsules entériques. Les auteurs montrent que seule l'association voie systémique + voie orale sous forme de capsules, donne de bons résultats.

5 Forest et al, Infect. Immun. (1992) 60 (2) : 465 teste chez l'homme, plusieurs modes d'immunisation en vue d'induire une réponse IgA à l'encontre de *Salmonella typhi*. Les voies orale et sous-cutanée sont utilisées comme suit : orale ; orale/orale ; orale/sous-cutanée ; et sous-cutanée/orale. Les auteurs montrent qu'une première injection parentérale suivie quelques jours après par une deuxième dose absorbée par  
10 voie orale ne favorise pas la réponse IgA. Par contre, l'absorption du vaccin par voie orale, répétée une fois, donne de bons résultats.

Hartman et al, Infect. Immun. (1994) 62 (2) : 412 décrit plusieurs protocoles d'immunisation à l'encontre de *Shigella*. En particulier, l'un d'entre eux comprend une  
15 première injection par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée suivie d'un rappel par voie oculaire. Ce protocole est testé dans le modèle cobaye de la keratoconjunctivite. Les auteurs montrent que chez les animaux naïfs, l'immunisation par voie mucosale est nécessaire à l'induction d'une protection. La double immunisation parentérale et mucosale augmente le niveau de protection.

20 Nedrud et al, J. Immunol. (1987) 139 : 3484 décrit une méthode d'immunisation à l'encontre des infections à virus Sendai (infections du naso-pharynx pouvant éventuellement évoluer en bronchite et pneumonie). Le site effecteur au niveau duquel la réponse immunitaire pourrait être recherchée par la mise en oeuvre  
25 de cette méthode, est donc l'ensemble du tractus respiratoire. La méthode de Nedrud et al comprend deux étapes majeures : une primo-immunisation par voie orale (intragastrique) et un rappel par voie nasale. De manière générale, on considère que la voie orale (intragastrique) n'est pas la voie optimale qui permettrait à un agent inducteur (ici le virus Sendai) d'atteindre un des sites inducteurs d'une réponse  
30 immunitaire au niveau du tractus respiratoire.

Il a maintenant été trouvé qu'une réponse immunitaire en un site mucosal quelconque et à l'encontre d'un antigène quelconque, pouvait être grandement favorisée en mettant en oeuvre un protocole d'immunisation associant plusieurs  
35 voies.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique destinée à induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire protectrice à l'encontre d'un antigène, au niveau d'un site mucosal effecteur, qui  
40 comprend au moins deux produits identiques ou différents contenant chacun un agent inducteur de la réponse immunitaire sélectionné parmi l'antigène et à condition que

- 5 l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène, pour une administration concomitante ou consécutive ; l'un des produits étant formulé de manière à être administré par voie naso-buccale afin que l'agent inducteur soit ciblé vers le ou les site(s) inducteur(s) d'une réponse immunitaire au niveau du naso-oro-pharynx ou des glandes salivaires, l'autre produit étant formulé de
- 10 manière à être administré par une voie mucosale appropriée autre que la voie nasale, afin que l'agent inducteur soit ciblé vers le ou les site(s) inducteur(s) d'une réponse immunitaire au niveau du site effecteur où la réponse immunitaire est recherchée.

- De manière optionnelle, la composition pharmaceutique selon l'invention
- 15 comprend un troisième produit, identique ou différent aux deux premiers, qui contient un agent inducteur de la réponse immunitaire, sélectionné parmi l'antigène et à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène et qui est formulé pour être administré par voie systémique, de préférence avant les deux premiers produits déjà cités.
- 20

En d'autres termes, l'invention a pour objet un kit pour induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire mucosale à l'encontre d'un antigène, au niveau d'un site effecteur, qui comprend :

- 25 (i) de manière optionnelle, un premier agent inducteur de la réponse immunitaire sélectionné parmi l'antigène et, à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène, un fragment d'ADN ou d'ARN codant pour l'antigène ; et

- 30 (ii) un deuxième et un troisième agents inducteurs de la réponse immunitaire sélectionné parmi l'antigène et, à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène, un fragment d'ADN ou d'ARN codant pour l'antigène ; avec

- 35 (a) de manière optionnelle, des instructions pour l'administration par voie systémique, du premier agent inducteur,

- (b) des instructions pour l'administration par voie naso-buccale du deuxième agent inducteur,

5 (c) des instructions pour l'administration du troisième agent inducteur par une voie mucosale appropriée autre que la voie nasale, afin que l'antigène soit ciblé vers le ou les site(s) inducteur(s) de la réponse immunitaire au niveau du site effecteur où la réponse immunitaire est recherchée, et

10 (d) des instructions pour l'administration concomitante ou consécutive des premier, deuxième et troisième agents inducteurs.

L'invention concerne également une méthode pour induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène, au niveau d'un site effecteur  
15 mucosal, selon laquelle, dans un ordre quelconque :

(i) on administre de manière optionnelle au mammifère hôte, un premier agent inducteur de la réponse immunitaire sélectionné parmi l'antigène et, à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer  
20 l'antigène, un fragment d'ADN ou d'ARN codant pour l'antigène, par voie systémique ;

(ii) on administre au mammifère hôte, un deuxième agent inducteur de la réponse immunitaire sélectionné parmi l'antigène et, à condition que l'antigène soit de  
25 nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène, un fragment d'ADN ou d'ARN codant pour l'antigène, par voie nasale et / ou buccale (naso-buccale) ; et

(iii) on administre au mammifère hôte, un troisième agent inducteur de la  
30 réponse immunitaire sélectionné parmi l'antigène et, à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène, un fragment d'ADN ou d'ARN codant pour l'antigène, par la voie mucosale appropriée autre que la voie nasale afin que l'antigène soit ciblé vers le ou les site(s) inducteur(s) de la réponse immunitaire au niveau du site effecteur où la réponse immunitaire est  
35 recherchée.

L'administration du premier agent inducteur peut être mise en oeuvre avantageusement en dose unique, par injection systémique, telle qu'une injection intra-veineuse, intra-musculaire, intra-dermique ou sous-cutanée. Le choix du site et  
40 de la voie d'injection dépendra notamment des ganglions lymphatiques que l'on souhaite cibler. On indique que si on veut par exemple cibler les ganglions

5 coeliaques, il est préférable d'effectuer l'injection dans la région dorso-lombaire en utilisant la voie intramusculaire (plutôt que la voie sous-cutanée). De manière préférée, cet agent inducteur doit se trouver sous forme particulaire. L'agent inducteur est avantageusement complétement par un adjuvant, soit par précipitation, soit par adsorption. L'adjuvant peut être n'importe quel adjuvant classique de type phosphate  
10 ou hydroxide d'aluminium, phosphate de calcium, ou encore un adjuvant tel que le polyphosphazène. Ce peut être aussi un adjuvant de type liposome, microsphère, ISCOM ou virus-like-particules (VLPs) ; ces derniers étant d'un usage particulièrement avantageux lorsque l'on veut cibler les ganglions qui draine la région uro-génitale. Tous ces adjuvants sont à la portée de l'homme de l'art. Le dosage  
15 approprié varie en fonction de certains paramètres, par exemple de l'individu traité ou de la nature de l'agent inducteur. A toutes fins utiles, on indique qu'une dose d'un antigène peut varier de 5 à 100 µg, de préférence de 25 à 50 µg.

Par "voie naso-buccale", on entend aux fins de la présente invention, la voie qui  
20 permet à un immunogène d'atteindre essentiellement l'anneau de Waldeyer ou son équivalent le NALT, chez des espèces autres que l'espèce humaine. On précise que la voie naso-buccale (ou buccale) ne doit pas être confondue avec ce qui est communément appelé "voie orale" et qui devrait être plus justement dénommée "voie intragastrique".

25 La voie orale, y compris la voie intragastrique, doit permettre à l'agent inducteur (antigène) d'atteindre majoritairement les muqueuses des parties basses (tube digestif et principalement l'intestin grêle et les plaques de Peyer), tandis que la voie buccale véhicule l'agent inducteur essentiellement vers les muqueuses des  
30 parties hautes. Le site d'entrée de la voie buccale et celui de la voie orale peuvent être les mêmes ; dans ce cas là il s'agit de la bouche. Néanmoins les trajectoires sont essentiellement différentes.

La même remarque s'applique lorsqu'il s'agit de la voie pulmonaire qui permet  
35 à l'agent inducteur d'atteindre les muqueuses des parties médianes (bronches).

En vue d'optimiser la réponse immunitaire que l'on recherche, la formulation de l'immunogène a aussi son importance. D'une manière générale, il a déjà été montré qu'un antigène particulaire était plus efficace dans l'induction d'une réponse  
40 immunitaire mucoale, qu'un antigène soluble.

- 5        La voie qui sera suivie par l'agent inducteur au départ d'un site d'entrée identique dépend de plusieurs facteurs ; entre autres, de la nature et de la taille des particules sous lesquelles l'agent inducteur sera mis en forme, et de l'appareil, avantageusement spray ou aérosol, qui est utilisé pour propulser les particules, en particulier de sa forme, de son jet directionnel, et de la vitesse de propulsion.
- 10        Pour ce qui concerne la nature des particules, un grand choix est à la disposition de l'homme du métier ; ce choix, bien que non-limitatif se répartit avantageusement en deux groupes : les liposomes et les microsphères. Les méthodes de préparation de ces particules sont conventionnelles et il est à la portée de l'homme
- 15        de l'art d'en sélectionner une selon ses besoins propres et de déterminer la taille des particules qui doit être appropriée pour que l'agent inducteur soit véhiculé selon la voie qui aura été retenue, et réparti de manière optimale au niveau de la muqueuse ciblée.
- 20        Ainsi, on propose un diamètre particulaire inférieur à 10  $\mu\text{m}$ , pour administration par voie nasale ou buccale ; pour administration par voie pulmonaire, un diamètre de 0,05 à 10  $\mu\text{m}$ , de préférence de 0,05 à 5  $\mu\text{m}$ , ; pour administration par voie orale, un diamètre de 0,05 à 10  $\mu\text{m}$ , de préférence de 0,05 à 5  $\mu\text{m}$ .
- 25        Les sites effecteurs principaux au niveau desquels une réponse immunitaire peut être recherchée sont l'appareil respiratoire (bronches, naso-pharynx, poumons), l'estomac, l'intestin et l'appareil uro-génital. Lorsqu'il s'agit de l'appareil respiratoire, le troisième agent inducteur sera avantageusement formulé pour être administré par
- 30        voie pulmonaire (e.g. liposomes, microsphères, ... etc.). Lorsqu'il s'agit de l'estomac ou de l'intestin, le troisième agent inducteur sera avantageusement formulé pour être administré par voie orale, y compris la voie intragastrique (e.g. en présence d'une protection entérique, telle que liposomes, microsphères, bicarbonate ou capsule de gélatine). Lorsqu'il s'agit de l'intestin ou de l'appareil uro-génital, le troisième agent
- 35        inducteur sera avantageusement formulé pour être administré par voie uro-génitale, par exemple sous forme de capsule vaginale ou par voie rectale, par exemple sous forme de suppositoire.
- 40        Le deuxième ou troisième agent inducteur peut être en outre complémenté par un adjuvant autre que les liposomes ou les microsphères, et dépourvu de toxicité autre que les sous-unités non-toxiques ou les formes détoxifiées des toxines bactériennes.

Selon un mode de réalisation préféré, on utilise pour adjuvant du deuxième ou du troisième agent inducteur, le lipopolysaccharide majeur (MPLA : major lipopolysaccharide antigen) d'une bactérie, par exemple d'*E. coli*, de *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* ou *Shigella flexneri*.

En effet, on a maintenant trouvé que ce type de composé avait de bonnes propriétés adjuvantes lorsqu'il s'agissait d'immuniser par voie mucosale.

C'est pourquoi un autre aspect de l'invention porte sur l'utilisation du MPLA à titre d'adjuvant mucosal pour la préparation d'une composition (i) contenant un antigène ou, à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène, un fragment d'ADN ou d'ARN codant pour l'antigène, (ii) destinée à l'induction d'une réponse immunitaire mucosale à l'encontre de l'antigène et (iii) destinée à être administrée par voie mucosale.

A titre indicatif, on mentionne que le deuxième ou troisième agent inducteur, lorsqu'il s'agit d'un antigène, peut être administré à raison de 100 µg à 1 mg la dose.

Selon un mode préféré, le premier agent inducteur (voie systémique), quand administré, est administré en primo-injection en laissant courir un délai de 7 à 45 jours, de préférence de 20 à 30 jours avant le premier rappel (administration du deuxième ou du troisième agent inducteur).

Selon un mode alternatif, le premier agent inducteur peut être aussi administré en même temps que le deuxième ou troisième agent inducteur.

Le deuxième et troisième agents inducteurs peuvent être administrés de manière concomitante ou consécutive. Lorsqu'administrés de manière étalée dans le temps, ils le sont avantageusement de 7 à 45 jours, de préférence à 28 jours d'intervalle.

Si nécessaire, on peut aussi envisager d'administrer le premier et le deuxième agents inducteurs simultanément (c'est-à-dire approximativement le même jour) et de répéter une fois cette opération à plusieurs jours d'intervalle.



5           Le choix de chacun des trois agents inducteurs s'effectue de manière indépendante les uns des autres. Avantageusement au moins un des trois devra être l'antigène. Assez communément, ces trois agents inducteurs peuvent être les mêmes et dans ce cas là, il s'agira avantageusement de l'antigène.

10           En alternative à un antigène de nature protéique, on peut aussi utiliser (i) soit un vecteur vaccinal *e.g.* type poxvirus ou adénovirus comportant un fragment d'ADN codant pour cet antigène et placé sous le contrôle d'un promoteur approprié, (ii) soit ce fragment d'ADN tel quel (non-vectorisé), mis sous forme plasmidique ou non (de préférence le fragment d'ADN sera inséré dans un plasmide plutôt que de rester en  
15 l'état de simple unité de transcription), présenté en formulation liposomale (anionique ou cationique) ou non, (iii) ou encore le fragment d'ARN correspondant. Ces opportunités ont déjà été décrites dans la littérature.

20           Afin de mettre en oeuvre l'une quelconque des différentes possibilités évoquées au paragraphe précédent, on utilise un promoteur capable d'induire dans des cellules de mammifères, l'expression du fragment d'ADN codant pour l'antigène. Pour ce que l'on appelle communément les vaccins à base d'ADN (pour se différencier des vaccins à base de vecteurs viraux), le promoteur précoce du cytomégalo virus humain (hCMV) est un promoteur de choix. Pour ce type de vaccination, on utilisera de  
25 préférence, un plasmide incapable de se répliquer chez les mammifères. Un tel plasmide se doit aussi d'être essentiellement non-intégratif.

30           Selon un mode de réalisation préféré, l'antigène d'une bactérie pathogène pour le mammifère-hôte est un antigène d'*H. pylori*, par exemple la forme apoenzymatique de l'uréase d'*H. pylori* ou l'une des sous-unités ureA ou ureB de cette même uréase.

35           De manière à la fois plus générale en ce qui concerne la méthode d'immunisation et plus ciblée en ce qui concerne l'antigène, on précise que l'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un fragment d'ADN codant pour un antigène d'*H. pylori*, dans la fabrication d'une composition destinée à prévenir ou traiter une infection à *H. pylori* et destinée à être administrée par voie nasale ou naso-buccale. A cette fin, le fragment d'ADN utilisé à titre d'agent vaccinal, répond aux critères énoncés ci-dessus.

40           Il a été aussi trouvé que pour induire une réponse immunitaire mucoale à l'encontre d'un organisme pathogène infectant l'estomac ou l'intestin, il ne serait pas

indispensable d'administrer un immunogène au niveau de l'un de ces sites, mais qu'il pourrait suffire de l'administrer par la voie haute c'est-à-dire par voie naso-buccale, éventuellement en y associant une voie systémique.

5 C'est pourquoi, sous un autre aspect, l'invention concerne une composition destinée à induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène, au niveau de l'estomac ou de l'intestin, qui comprend un agent inducteur de la réponse immunitaire, sélectionné parmi l'antigène et, à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer  
10 l'antigène, un fragment d'ADN ou d'ARN codant pour l'antigène, l'agent inducteur étant formulé de manière à être administré par la voie naso-buccale.

Sous ce même aspect, l'invention porte également sur l'utilisation d'un produit sélectionné parmi un antigène et, à condition que l'antigène soit de nature protéique,  
15 une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène, un fragment d'ADN ou d'ARN codant pour l'antigène, pour la préparation d'une composition destinée à induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire à l'encontre du produit, au niveau de l'estomac ou de l'intestin, et destinée à être administrée par la voie naso-buccale.

20 Une telle composition, lorsqu'elle comprend un antigène d'un organisme pathogène infectant la muqueuse stomacale ou intestinale, est notamment utile en ce qu'elle protège le mammifère hôte contre l'infection en question, notamment en offrant une protection de longue durée, en mettant en jeu des lymphocytes T et B à mémoire. Il peut s'agir des infections à *H. pylori*, à *V. cholerae*, à *Shigella flexneri*,  
25 *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritis*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* entérotoxigènes et entéropathogènes. Pour ce qui concerne l'antigène, ce dernier peut être l'agent pathogène lui-même sous forme tuée, lysée ou atténuée, ou bien des composants antigéniques de ce pathogène, tel qu'un polysaccharide capsulaire, ou des  
30 antigènes de membrane, sous forme purifiée, ou un polypeptide caractéristique de ce pathogène, soit directement purifié à partir du pathogène, soit obtenu par les techniques de l'ADN recombinant.

Par exemple, lorsqu'il s'agit d'une composition destinée à prévenir les infections  
35 à *H. pylori*, un antigène de choix peut être l'apoenzyme de l'uréase, composée des sous-unités A et B dont les fragments d'ADN correspondants sont décrits dans e.g. Labigne et al, J. Bact. (1991) 173 (6) : 1920, ou bien l'une des sous-unités de

- 5 l'apoenzyme, ou bien la cytotoxine (WO93/18150) ou bien encore des protéines de la famille des adhésines (protéines capables de se lier aux récepteurs des cellules hôte et se faisant, capables de médier l'accrochage du pathogène aux cellules hôte et d'initier le processus infectieux) ou des protéines régulées par le fer.
- 10 Dans le cas d'un vaccin anti-choléra, un antigène de choix peut être la sous-unité B de la toxine cholérique, comme déjà décrit dans la littérature.

L'invention est illustrée ci après par référence aux figures 1 à 5.

- 15 La Figure 1 présente l'analyse par Elispot de la réponse immunitaire induite par administration de sous-unité B de la toxine cholérique (CTB), dans les glandes salivaires (1A) et dans l'estomac (1B). Les résultats concernent trois protocoles d'immunisation : sous-cutanée / orale (Sc O) ; sous-cutanée / nasale (Sc N) ; et sous-cutanée / orale + nasale (Sc O + N). Par "orale" on entend bien sûr "intra-gastrique".
- 20 Les hachures foncées sur fond clair correspondent à la réponse IgA. Les hachures claires sur fond foncé correspondent à la réponse IgG2a. La réponse dans l'estomac est présentée en nombre de souris répondeuses sur un lot de 5 souris : le nombre de spots par million de cellules est de l'ordre de 9.
- 25 La Figure 2 présente l'analyse par Elispot de la réponse immunitaire induite dans les glandes salivaires (2A) et dans l'estomac (2B) par administration selon le protocole sous-cutanée / sous-cutanée + orale + nasale (Sc / Sc + O + N), de la CTB. Par "orale" on entend bien sûr "intra-gastrique". Les hachures foncées sur fond clair correspondent à la réponse IgA. Les hachures claires sur fond foncé correspondent à
- 30 la réponse IgG2a. La réponse dans l'estomac est présentée en nombre de souris répondeuses sur un lot de 5 souris ; le nombre de spots par million de cellules est de l'ordre de 8.2.
- 35 La Figure 3 présente l'analyse par Elispot de la réponse immunitaire induite dans les glandes salivaires (3A) et dans l'estomac (3B), par administration de l'uréase Jack Bean selon le protocole sous-cutanée (alum) / orale + nasale (liposome). Par "orale" on entend bien sûr "intra-gastrique". Les hachures foncées sur fond clair correspondent à la réponse IgA. Les hachures claires sur fond foncé correspondent à
- 40 la réponse IgG2a. La réponse dans l'estomac est présentée en nombre de souris répondeuses sur un lot de 5 souris ; le nombre de spots par million de cellules est de l'ordre de 620.

5

La Figure 4 présente l'analyse par Elispot de la réponse immunitaire induite dans les glandes salivaires (4A) et dans l'estomac (4B) par administration de l'uréase Jack Bean selon le protocole sous-cutané (liposomes) / orale + nasale (liposomes). Par "orale" on entend bien sûr "intragastrique". Les hachures foncées sur fond clair correspondent à la réponse IgA. Les hachures claires sur fond foncé correspondent à la réponse IgG2a. La réponse dans l'estomac est présentée en nombre de souris répondeuses sur un lot de 5 souris ; le nombre de spots par million de cellules est de l'ordre de 15.

15

La Figure 5 présente le plasmide pTG8665, utilisé pour produire l'apoenzyme de l'uréase d'*H. pylori*.

La Figure 6 présente le plasmide pCMC/E1a dans lequel le fragment *HinDIII* (1) - *SacII* (754) contient le promoteur hCMV, le fragment *XhoI* (771) - *SmaI* (2104) contient l'ORF E1a, et le fragment *SmaI* (2104) - *EcoRI* (2810) contient l'extrémité 3' BGH et le fragment *EcoRI* (2810) - *HinDIII* (1) correspond au squelette pUC19.

20

La Figure 7 présente le plasmide pCB-11.

25

La Figure 8 présente le plasmide pCB-ureB dans lequel l'ORF ureB va du nucléotide 777 au nucléotide 2487.

La figure 9 indique sous forme de diagramme, les titres en anticorps anti-uréase relevés chez des souris Balb/c immunisées avec le plasmide pCB-ureB. Les courbes en plein présente les titres en IgG et les courbes en pointillés, les titres en IgA. ■ correspond à une immunisation par voie intranasale répétée trois fois (J0, 21 et 42 ; plasmide seul ou plasmide + liposomes). ♦ correspond à une primo-immunisation par voie intramusculaire (plasmide seul), suivie par deux rappels à J21 et 42 par voie intranasale (plasmide + liposomes). ● correspond à une primo-immunisation par voie intradermique (plasmide seul), suivie par deux rappels à J21 et 42 par voie intranasale (plasmide + liposomes).

30

35

La Figure 10 présente sous forme de diagramme, la densité optique du milieu stomacal des souris, après immunisation éventuelle avec l'apoenzyme de l'uréase d'*H. pylori* et épreuve. Première colonne : souris non-infectées ; deuxième colonne : souris ayant reçues des liposomes vides, par primo-immunization sous-cutanée suivie

40

- 5 de deux rappels par voies (nasale + intragastrique) ; troisième colonne : souris ayant reçues des liposomes avec uréase, par primo-immunization sous-cutanée suivie de deux rappels par voies (nasale + intragastrique) ; quatrième colonne : souris ayant reçues des liposomes avec uréase, par administration répétée trois fois par voies (nasale + intragastrique). Dans tous les cas, il s'agit de liposomes DC-Chol.

5    **Exemple 1 : Induction d'une réponse immunitaire mucoale à l'encontre de la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB)**

1.A. **Préparation des compositions immunisantes**

10            1.A. a) **Pour administration par voie sous-cutanée**

1 µl d'une préparation de CTB purifiée et concentrée à 10 mg/ml (soit 10 µg de CTB) est mélangée à 100 µl d'une préparation d'hydroxyde d'aluminium à 1 % . On dilue en tampon PBS pour obtenir un volume  
15            final de 500 µl. Ceci constitue une dose individuelle.

1.A. b) **Pour administration par voie orale (intra-gastrique)**

20            Un volume de billes de latex de 3 µM (Polysciences cat 17 34) est prélevé puis lavé 3 fois en tampon PBS (centrifugation 1.000 trs/min. pendant trois minutes). Les billes sont ensuite mélangées à une préparation de CTB purifiée et concentrée à 10 mg/ml afin d'obtenir une préparation dans laquelle la CTB est diluée au 1/20 (soit à une concentration finale de 0.5 mg/ml). Cette préparation est placée pendant  
25            2 hrs sous agitation.

La préparation est ensuite diluée au 1/25 avec du tampon carbonate 200 µM.

30            1.A. c) **Pour administration par voie nasale**

Une préparation de CTB coatée sur billes de latex est obtenue comme décrit dans la section 1.A. b) à l'exception de la dilution finale en tampon carbonate.

35            La préparation est ensuite diluée en tampon PBS selon les besoins.

1.1. d) **Pour administration par voie orale + nasale**

40            L'administration est réalisée par la conjonction des administrations orale et nasale telles que décrites en 1.A. b) et 1.A. c).

5

**1.B. Protocole d'immunisation**

Trois protocoles d'immunisation sont comparés. Il s'agit de :

10

- 1) sous-cutanée / orale (intragastrique)
- 2) sous-cutanée / nasale
- 3) sous-cutanée / orale (intragastrique) + nasale

15

Des souris balbC reçoivent par voie sous-cutanée, 10 µg de CTB adjuvé par de l'alum comme décrit dans la section 1.A. a), sous un volume de 500 µl.

Des souris constituées en lot témoin reçoivent en sous-cutanée 500 µl de PBS.

20

28 jours après l'injection sous-cutanée, les souris de l'essai sont réparties en 3 groupes.

25

Les souris du premier groupe reçoivent en intragastrique, par l'intermédiaire d'une canule couplée à une seringue de 1 ml, 10 µg de CTB coatés sur billes de latex comme décrit dans la section 1.A. b) sous un volume de 500 µl. Des souris issues du lot témoin reçoivent 500 µl de tampon carbonate, par la même voie.

30

Les souris du deuxième groupe reçoivent par voie nasale 10 µg de CTB coatés sur billes de latex comme décrit dans la section 1.A. c) sous un volume de 20 µl. Ces 20 µl sont déposés goutte à goutte sur les narines. Des souris issues du lot témoin reçoivent 20 µl de PBS. par la même voie.

35

Les souris du troisième groupe reçoivent simultanément 10 µg de CTB par voie orale (intragastrique) et 10 µg de CTB par voie nasale. La préparation de CTB coatée sur billes de latex est obtenue comme décrit dans la section 1.A. d). Des souris sont constituées en témoins.

40

15 jours après le rappel, l'estomac et les glandes salivaires des souris sont prélevés ; les cellules sont extraites selon le protocole décrit dans Mega et al, J. of Immunology (1992) 148 : 2030 et la réponse IgA est analysée en Elispot

- 5        selon la méthode décrite dans Czerkinsky et al, In Theoretical and Technical aspects of ELISA and other Solid Phase Immuno Assays (DM. Kennenys and S. J. Chalamombe Eds) : 217-239. John Willy & Sons, Chichester, NY

10        Les résultats sont présentés dans la Figure 1 et commentés comme suit :

15        Le protocole sous-cutané / orale (intragastrique) se révèle incapable d'induire une réponse immunitaire mucoale importante tandis qu'une telle réponse est observée dans le cas des protocoles sous-cutané / nasale et sous-cutané / orale (intragastrique) + nasale.

20        Ce dernier protocole se révèle être le meilleur dans la mesure où une bonne réponse locale représentée par les IgA, est obtenue tant dans les glandes salivaires que dans l'estomac.

20        **1.C. Protocole d'immunisation supplémentaire**

Des souris ayant reçu une injection sous-cutanée de CTB comme décrit dans la section 1.B., reçoivent 28 jours après, en simultané :

- 25        -    40 µg de CTB telle que préparée dans la section 1.A. d) par voie orale (intragastrique), sous un volume de 500 µl.
- 30        -    10 µg de CTB telle que préparée dans la section 1.A. d), par voie nasale, sous un volume de 20 µl.
- 30        -    10 µg de CTB telle que préparée dans la section 1.A. a), par voie sous-cutanée, sous un volume de 300 µl.

35        15 jours après le rappel, l'estomac et les glandes salivaires des souris sont prélevés ; les cellules sont extraites et la réponse IgA est analysée en Elispot.

40        Les résultats sont présentes dans la Figure 2. On obtient une bonne réponse immunitaire de type IgA (5/5 souris répondent), marqueur d'une réponse immunitaire locale au niveau des muqueuses.



5    **Exemple 2 : Induction d'une réponse immunitaire mucosale à l'encontre de l'uréase Jack Bean.**

2.A. **Préparation des compositions immunisantes**

10        2.A. a) **uréase adjuvée en alum.**

5 µl d'une préparation uréase Jack Bean (Boehringer ; ref. 737 348) concentré à 4 mg/ml en tampon PBS sont mélangés à 100 µl d'une préparation d'hydroxyde d'aluminium à 1 %. On dilue en tampon PBS  
15        pour obtenir un volume final de 500 µl contenant 20 µg uréase. Ceci constitue une dose individuelle.

2.A. b) **uréase en liposomes**

20        Trois techniques sont utilisées comme suit :

1. **Injection d'éthanol**

16,4 mg d'un mélange lipidique composé de Cholestérol (Sigma), de  
25        Dipalmitoylphosphatidylcholine (Nattermann Phospholipids) et de sel de sodium du Dimyristoylphosphatidylglycérol dans des proportions molaires de 5:4:1 sont dissous dans 50 µl d'éthanol absolu. La solution est injectée par l'intermédiaire d'une seringue Hamilton dans 2 ml d'une solution aqueuse contenant 4 mg/ml d'uréase Jack Bean, éventuellement  
30        tamponnée par du tampon PBS dilué au 1/10. La préparation est maintenue à 45 ° C, sous agitation.

Au contact de l'eau les lipides s'organisent spontanément sous forme de liposomes (majoritairement unilamellaires de taille moyenne 50-100 nm)  
35        en piégeant un certain volume de la solution d'uréase.

Ces liposomes sont purifiés (isolés de l'excès d'uréase libre) par gel filtration sur une colonne de Sepharose CL-4B (Pharmacia). Le taux d'encapsulation de l'uréase mesuré à l'aide d'uréase marquée à l'iode 125  
40        (technique Enzymobeads™, Biorad). varie de 3 à 6 %. Si nécessaire, la

5 suspension liposomale est concentrée par ultrafiltration dans une cellule Novacell™ (Filtron) possédant une limite d'exclusion de 10 kD.

## 2. Extrusion

10 16,4 mg d'un mélange lipidique composé de Cholestérol (Sigma), de Dipalmitoylphosphatidylcholine (Nattermann Phospholipids) et de sel de sodium du Dimyristoylphosphatidylglycérol dans des proportions molaires de 5:4:1 sont dissous dans 4 ml de chloroforme dans un ballon Pyrex de 25 ml. La solution est évaporée (Rotavapor Buchi) pour former  
15 un fin film lipidique sur les parois du ballon. Le film lipidique est séché sous vide poussé pendant 2 heures, puis repris avec 2 ml d'eau contenant 8 mg d'uréase de Jack Bean. Après 4 heures d'agitation à 45 ° C la suspension est extrudée (Extruder™, Lipex Biomembranes Inc., Vancouver) 5 fois à travers 2 membranes superposées en polycarbonate de porosité 400 nm (Nucléopore™, Costar) pour former une population  
20 homogène de liposomes majoritairement unilamellaires d'environ 400 nm de diamètre et contenant l'uréase. Ces liposomes sont purifiés (isolés de l'excès d'uréase libre) par gel filtration sur une colonne de Sepharose CL-4B, Pharmacia). Le taux d'encapsulation de l'uréase, mesuré à l'aide d'uréase marquée à l'iode 125 (technique de marquage Enzymobeads™, Biorad), varie de 5 à 10 %. Si nécessaire, la suspension liposomale est concentrée par ultrafiltration dans une cellule Novacell™ (Filtron) possédant une limite d'exclusion de 10 kD.

## 30 3. Méthode microfluidiseur

82 mg d'un mélange lipidique composé de Cholestérol, de Dipalmitoylphosphatidylcholine et de sel de sodium du Dimyristoylphosphatidylglycérol dans des proportions molaires de 5:4:1,  
35 obtenu par lyophilisation d'une solution éthanolique (D3F - France) sont repris avec 10 ml de tampon Hepes 10 mM, 150 mM NaCl, pH 7, 4 contenant 3,6 mg/ml de la forme apoenzymatique recombinante de l'uréase de *H. pylori*. Après 4 heures d'agitations à 45 °C, la suspension est micorfluidisée par 5 passages à 500 kPa dans un microfluidiseur M110S (Microfluidics Co.) pour former une population homogène de,  
40 liposomes majoritairement unilamellaire d'environ 100 nm de diamètre et

5                   contenant l'uréase. Ces liposomes sont purifiés par gel filtration (Colonne  
de Sépharose CL-4B, Pharmacia). Le taux d'encapsulation de l'uréase,  
mesuré par dosage de protéine à l'aide du kit Micro BCA (Pierce) est de  
14,5 %. Si nécessaire, la suspension liposomale est concentrée par  
10                   ultrafiltration dans une cellule Novacell (Filtron) possédant une limite  
d'exclusion de 10 kD.

#### 2.A. c) uréase en liposomes, adjuvé par du MPLA

15                   Lorsque l'on prépare des liposomes, du MPLA (Extrait d'*E. coli* ; Sigma)  
peut être ajouté au mélange lipidique, dans la proportion de 1.2 ou 5 %  
par rapport à la masse de lipide.

#### 2.B. Protocole d'immunisation

20                   Deux protocoles d'immunisation sont testés. Il s'agit de :

- 1) sous-cutanée (alum) / [orale (intragastrique) + nasale] (liposomes)
- 2) sous-cutanée (liposomes) / [orale (intragastrique) + nasale]  
25                   (liposomes)

Des souris OF1 reçoivent par voie sous-cutanée :

- soit 20 µg uréase adjuvée par de l'alum comme décrit dans la  
30                   section 2.A. a) sous un volume final de 500 µl,
- soit 20 µg uréase en préparation liposomale telle que obtenue dans  
la section 2.A. b) sous un volume de 500 µl.

35                   28 jours après l'injection sous-cutanée, les souris reçoivent en simultané :

- par voie orale, (intragastrique), 20 µg uréase en préparation  
liposomale telle que obtenue dans la section 2.A. b), sous un  
volume de 500 µl ; et

5                   -     par voie nasale, 20 µg uréase en préparation liposomale telle que  
obtenue dans la section 2.A. b), sous un volume de 50 µl.

15                   15 jours après le rappel, l'estomac et les glandes salivaires des souris sont  
prélevés ; les cellules sont extraites selon le protocole décrit dans le préambule  
aux exemples et la réponse IgA est analysée en Elispot selon la méthode décrite  
10                   dans le préambule.

15                   Les résultats sont présentés dans les Figures 3 et 4. La Figure 3 montre  
que, dans le cas du protocole sous-cutanée (alum) / [orale (intragastrique) +  
nasale] (liposomes), la réponse IgA dans les glandes salivaires (3a), bien que  
faible, est majoritaire. tandis que pour ce qui est de l'estomac (3b), 3 souris sur  
5 répondent à l'immunisation avec un nombre élevé de spots.

20                   La Figure 4 montre que, dans le cas du protocole sous-cutanée  
(liposomes) / [orale + nasale] (liposomes), la réponse est très bonne dans les  
glandes salivaires (4a) tandis qu'elle est faible dans l'estomac (4b). Ceci  
suggère qu'outre le protocole utilisé, la formulation de l'antigène à son  
importance.

### 25     Exemple 3 : Kit de vaccination contre les infections à *H. pylori*

30                   Dans un kit, sont réunies trois préparations contenant l'apoenzyme de uréase d'  
*H. pylori*, formulées chacune de manière différente, selon le mode d'administration  
envisagé.

#### 3.A. Préparation de l'apoenzyme

35                   A partir d'un des plasmides décrits dans Labigne et al (supra) (pILL914),  
on génère par PCR, à l'aide des amorces OTG5973 et OTG5974, un fragment  
codant pour la partie N-terminale d'UreA (jusqu'au site *Hind*III interne) et  
contenant un site *Bsp*HI au niveau du codon d'initiation de la traduction de  
UreA.

*Bsp*HI

40                   OTG5973 : CCCAAATC ATG AAA CTC ACC CCA AAA GAG TTA  
Met Lys Leu Thr Pro Lys Glu Leu

5           GAT AAG TTG  
          Asp Lys Leu

*Hind*III

OTG 5974 : GCTTCTACATAGTTAAGCTTAATGCCTT

10

Le fragment généré par PCR est digéré par *Bsp*HI et *Hind*III et inséré simultanément avec le fragment *Hind*III de 2.35 kb de pILL914 porteur de la partie 3' de *ureA* et de *ureB*, dans le vecteur pTG3704 digéré par *Nco*I et *Hind*III, pour donner le plasmide pTG8665 tel que montré dans la Figure 5. Ce plasmide porte les gènes *ureA* et *ureB* fusionnés au promoteur *araB*. Le vecteur pTG3704 est décrit dans la demande de brevet européen EPA 584 266 publiée le 9 Mars 1994. Ce vecteur dérive du plasmide para13 (Cagnon et al, Prot. Eng. (1991) 4 : 843), par destruction du site *Sph*I par traitement à la polymérase Klenow.

20

On transforme la souche d'*E. coli* Xac-I (Normandy et al, PNAS (1986) 83 : 6548) par le plasmide pTG8665. La souche transformée est mise en culture en milieu LB complémenté à 100µg/ml d'ampicilline. En phase exponentielle de croissance, on ajoute 0.2 % d'arabinose en vue d'induire l'expression de *ureA* et *ureB*. Après différents temps d'induction (1 à 3 hrs), le niveau de production de UreA et UreB est très élevé (environ 10 % des protéines totales) et on prélève alors les cellules.

25

220 g de cellules sont récupérées par centrifugation à partir de 2.5 l de cultures.

30

Ces cellules sont reprises dans environ 1 litre de tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7.5 contenant 175 mg de PMSF (1 mM). Puis on ajoute à la suspension cellulaire 4 µl une solution de benzonase à 250 U/µl (Merck ; ref. 1654), soit 1 unité/ml final, ainsi que 1 ml d'une solution de MgCl<sub>2</sub> 1 M. On laisse agir pendant 30 min.

35

La suspension est ensuite introduite dans un appareil Rannie (homogénéisateur haute-pression) et soumise à une pression de 1.000 bars pendant 1 h, afin de casser les cellules.

40

5 Deux méthodes de purification peuvent être ensuite alternativement choisies.

### 3.A. a) Première méthode

10 Le passage des cellules est suivi par densité optique. Lorsque la D.O. est de l'ordre de 2,5 - 2, la suspension est retirée de l'appareil, et supplémentée avec 1 ml d'une solution d'EDTA 0,5 M. On centrifuge pendant 2 hrs à 10.000 rpm, puis on récupère le surnageant qui est centrifugé à 100 000 x g pendant 1 heure afin d'éliminer les membranes.

15 La purification est réalisée selon un protocole voisin de celui décrit par Hu et al, Infect. Immun. (1992) 60 : 2657. Le surnageant contenant les protéines solubles est ajusté à pH 6,8 puis chargé avec un débit de 4ml/min sur une colonne d'échange d'anions (DEAE-Sepharose Pharmacia) de volume 5cm x 25 cm, équilibrée avec le tampon KPO<sub>4</sub> 20 mM pH 6,8 contenant du PMSF 1mM (tampon PO). La colonne est éluée par un gradient linéaire de 0 à 0,5 M de KCl. Des fractions de 14 ml sont recueillies et analysées par SDS PAGE. Les fractions contenant l'uréase sous la forme la plus pure sont rassemblées.

25 On ajoute à la fraction ainsi obtenue du KCl afin que la concentration finale en KCl soit égal à 1M, la solution est chargée sur une colonne de Phényl-Sépharose (Pharmacia). La colonne est éluée par un gradient de KCl de 1 M à 0 M. Comme précédemment les fractions sont recueillies et analysées par SDS PAGE. Les fractions contenant l'uréase sous la forme la plus pure sont rassemblées et dialysées contre un tampon KPO<sub>4</sub> 20mM pH 7,5.

30 La fraction obtenue est chargée sur une colonne d'échange d'anions (Q-Sepharose Fast Flow; Pharmacia) équilibrée avec le tampon KPO<sub>4</sub> 20mM pH 7,5; comme précédemment la colonne est éluée par un gradient linéaire de 0 à 0,5 M de KCl et les fractions sont recueillies et analysées par SDS PAGE.

40 Les fractions contenant l'uréase sont rassemblées, concentrées par diafiltration sur une membrane dont le seuil de coupure est de 100 kDa et

5 la fraction est déposée sur une colonne de gel filtration (Sephacryl 400 HR) équilibrée dans le tampon  $\text{NaPO}_4$  20mM pH 7,5, après analyse par SDS PAGE des différentes fractions, celles contenant l'uréase sont recueillies, concentrées par diafiltration sur une membrane dont le seuil de coupure est de 100 kDa et la solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,22  $\mu\text{m}$ . Une solution de saccharose stérile est ajoutée à la solution d'uréase pour obtenir une concentration finale de 2%. La solution est ensuite lyophilisée et est conservée sous cette forme dans l'attente des étapes ultérieures.

### 15 3.A. b) Deuxième méthode

Ce surnageant est ajusté à pH 7,5 puis chargé à un débit de 4 ml/min. sur une colonne d'échange d'anion (Q - Sepharose fast flow ; Pharmacia ; ref. 17-0510-01) de volume 5 cm x 25 cm, équilibrée avec un tampon d'équilibre  $\text{KPO}_4$  20 mM pH 7,5 contenant du PMSF 1 mM. La colonne est éluée par un gradient linéaire de 0 à 0,5 M de KCl dans le tampon d'équilibre (vol. du gradient : 2,25 l ; débit : 4 ml/min).

On recueille des fractions de 14 ml que l'on analyse par SDS-PAGE. Les fractions les plus propres sont collectées et assemblées (en général il s'agit des fractions 82 à 121 à partir du début du gradient).

Le pool Q - Sepharose est chargé à un débit de 2 ml/min. sur une colonne de chelate de zinc (Chelating - Sepharose fast flow ; Pharmacia ; ref. 17-0575-02) de volume 2,6 cm x 11 cm. auparavant préparée comme suit.

La colonne est chargée en métal avec 2 volumes d'une solution de  $\text{ZnCl}_2$  0,2 M, puis rincée avec 3 volumes de NaCl à 0,5 M et ensuite avec 3 volumes d'un tampon d'équilibrage Tris-HCl 50 mM pH 8, contenant du NaCl 0,5 M, de l'imidazole 1 mM et du PMSF 1 mM. La colonne est lavée par 1 volume du tampon d'équilibrage à 10 mM d'imidazole puis rincée par 3 volumes du tampon d'équilibre à 1 mM d'imidazole.

Une fois la charge effectuée, on lave la colonne avec le tampon d'équilibrage jusqu'au retour à la ligne de base (lavage mis en oeuvre pendant la nuit à 0,2 ml/min).

5 La colonne est ensuite lavée par 200 ml de tampon d'équilibration à 7,5 mM d'imidazole à une vitesse d'écoulement de 1 ml/min.

10 L'élution a lieu en gradient linéaire de 7,5 mM à 30 mM d'imidazole dans le tampon d'équilibration (volume du gradient : 250 ml ; débit 1 ml/min).

On recueille des fractions de 10 ml que l'on analyse par SDS-PAGE. Les fractions contenant l'uréase pure sont collectées et assemblées (en général, il s'agit des fractions 19 à 30 à partir du début du gradient).

15 Le pool chelating-Sepharose est ensuite concentré par ultrafiltration sur membrane Amicon YM100, jusqu'à 25 ml.

20 Ce concentré est ensuite chargé sur une colonne de Sephacryl S-300 (Pharmacia ; ref. 17-0599-01) de volume 2,6 cm x 96 cm équilibrée en tampon  $\text{KPO}_4$  20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5.

25 La chromatographie s'effectue à un débit de 0,5 ml/min. On récupère des fractions de 10 ml que l'on analyse par SDS-PAGE. Les fractions contenant l'uréase pure sont assemblées (en général, il s'agit des fractions 21 à 27 à partir de la fin de la charge) et concentrées jusqu'à environ 2,5 mg/ml par ultrafiltration sur membrane Amicon YM100. La préparation de l'apoenzyme est filtrée sur une membrane de porosité 0,22  $\mu\text{m}$  et est conservée congelée à -20 °C ou lyophilisée en présence de sucrose par exemple.

30 Les préparations du kit sont les suivantes :

### 3.B. Apoenzyme adjuvée en alum pour administration par voie sous-cutanée

35 Une dose pour injection est préparée en adsorbant 20  $\mu\text{l}$  de la solution d'apoenzyme obtenue en 3.A. (soit 50  $\mu\text{g}$ ) avec 250  $\mu\text{l}$  d'une préparation d'hydroxide d'aluminium (alhydrogel ; Superfos) à 1 mg/ml, après une adsorption de 2 hrs à +4 °C, le volume final est ajusté à 500  $\mu\text{l}$  par l'addition de  
40 PBS.



5       **3.C. Apoenzyme en liposomes, pour administration par voie naso-buccale, en aérosol**

10       La forme apoenzymatique de l'uréase d'*H. pylori* est encapsulée dans des liposomes. Ces liposomes présentent un diamètre moyen de 100 nm et une teneur en protéine de 60 µg/mg de lipide.

15       On administre par voie naso-buccale une quantité totale de 0,1 mg d'uréase formulée. On utilise un aérosol à deux embouts (nez et bouche) de type commercialisé par la société VALOIS (Le Prieuré, BPG, 27110 Le Neubourg). Des pompes permettent de délivrer un volume fini dépendant du type de pompe, un embout de taille variable s'adaptant sur le récipient muni de sa pompe (300 µl maximum par administration, cette dose pouvant être répétée dans des délais choisis).

20       **3.D. Apoenzyme en liposomes pour administration intragastrique**

25       On administre une quantité totale de 0,5 mg d'uréase formulée par voie intragastrique. L'apoenzyme est préparée selon la méthode décrite dans le paragraphe 3.C., puis lyophilisée et reprise par 20 ml d'une solution de bicarbonate à 200 mM.

30       **3.E. Protocole d'immunisation**

30       Un adulte reçoit en sous-cutanée, la dose préparée en 3.B. 28 jours après la primo-injection, il reçoit par voie naso-buccale, la dose préparée en 3.C. et ingère le même jour, la dose préparée en 3.D.

35       **Exemple 4 : Kits de vaccination contre les infections à *H. pylori* (ADN codant pour la sous-unité ureB de l'urease, utilisé à titre d'agent vaccinal)**

40       **4.A. Construction des vecteurs plasmidiques**

40       Le vecteur d'expression eucaryote pCB-11 est construit à partir des trois éléments suivants :

- 5                   - Le plasmide pUC19 (disponible dans le commerce) préalablement digéré par *XbaI* et *EcoRI* ;
- Un fragment *SpeI-SacII* isolé du plasmide pCMV-E1a (Figure 6), qui comporte le promoteur précoce du cytomegalovirus humain (hCMV) tel que décrit dans *e.g.* USP 5 168 062 ; et
- 10                   - Un fragment *SacII-EcoRI* comportant la partie 3' du gène de l'hormone de croissance bovine incluant le signal de polyadenylation de l'ARNm ainsi que les séquences de stabilisation de l'ARNm. Ce fragment *SacII-EcoRI* est obtenu à partir du
- 15                   plasmide pBS-BGH construit par insertion d'un fragment *BamHI-EcoRI* issu du plasmide pCMV-E1a, dans le plasmide Bluescript (disponible dans le commerce).

20                   Ces trois fragments sont ligués ensemble pour former le plasmide pCB-11 (Figure 7).

                  Le gène *ureB* est amplifié par PCR à partir du plasmide pILL914 et à l'aide des amorces suivantes.

25                   amorce amont : 5' cgtctcgagccaccatgaaaaagattagcagaaaag  
                  amorce aval : 5' atcgctccgggcaggcctcttagaaaatgctaaagagttgcgccaagct.

                  L'amorce amont permet d'introduire le site de restriction *XhoI* et la séquence Kozak en amont du cadre de lecture ouvert (ORF) de *ureB*, tandis que l'amorce aval permet d'introduire le site *SmaI* en aval de l'ORF. Le fragment

30                   généré par PCR est digéré puis inséré dans le plasmide pCB-11, préalablement digéré par *XhoI* et *SmaI*, pour générer le plasmide pCB-*ureB* (Figure 8).

*E. coli* XL1 est transformé par ce plasmide puis mis en culture selon des techniques conventionnelles. Le plasmide ainsi amplifié est récolté de manière

35                   usuelle par lyse alcaline suivie d'un gradient isopicnique en chlorure de césium. L'ADN est repris soit en eau distillée, soit en eau physiologique (NaCl 9‰).

#### 4.B. Préparation d'une composition liposome/ADN

40                   On fabrique du bromure de O,O',O''-tridodécanyol-N-( $\omega$  triméthylammoniododécanyol)-tris-(hydroxyméthyl)aminoéthnae (communément appelé TC1-

5 12) selon la méthode décrite par Kunitake et al, J. Am. Chem. Soc. (1984) 106  
: 1978. Puis on dissout 10mg de ce produit dans 50µl d'éthanol. Cette  
préparation est ensuite injectée rapidement à l'aide d'une seringue Hamilton  
dans 2ml d'eau désionisée sous agitation à 42°C.

10 Des liposomes d'environ 50nm de diamètre se forment spontanément au  
cours de la dissolution de l'éthanol dans l'eau. On obtient ainsi une préparation  
liposomale contenant 5.2mM de TC1-12.

15 100µl de la préparation obtenue précédemment sont dilués par addition  
de 150µl d'eau distillée. Puis on ajoute 250µl d'une préparation aqueuse du  
plasmide pCB-ureB à 2µg/µl. Le rapport de charge (TC1-12/nucléotide) est de  
l'ordre de 0,35.

#### 20 4.C. Protocoles d'immunisation

Des souris Balb/c âgées de 6 à 8 semaines sont préalablement  
anesthésiées par injection d'un mélange xylazine + ketamine. Elles reçoivent 3  
administrations de 50µg de pCB-ureB, à 3 semaines d'intervalle.

25 Dans les différents protocoles d'immunisation, on utilise la voie  
intranasale (IN), la voie intramusculaire (IM) et la voie intradermique (ID).

30 Lors d'une administration par voie intranasale, 50µl d'une solution  
d'ADN à 100µg/ml en eau physiologique ou en mélange liposome/ADN tel que  
obtenu en 4.B. sont déposés gouttes à gouttes dans les narines.

Lors d'une administration par voie intramusculaire, 50µl d'une solution  
d'ADN à 100µg/ml en eau physiologique sont injectés dans les quadriceps à  
l'aide d'une seringue Hamilton équipée d'une aiguille de gauge 29.

35 Lors d'une administration par voie intradermique, 100µl d'une solution  
d'ADN à 500µg/ml sont injectés en 5 sites dans la peau du dos rasée au  
préalable, à l'aide d'un injecteur à jet pneumatique (Mesoflash™ 10).

40 Les différents protocoles d'immunisation sont comme suit :

Groupes	Primo-administration (Jour zéro)	Premier rappel (Jour 21)	Deuxième rappel (Jour 42)
1 (15 souris)	Lipo-pCB ureB/TN	Lipo-pCB ureB/TN	Lipo-pCB ureB/TN
2 (15 souris)	pCB ureB/TN	pCB ureB/TN	pCB ureB/TN
3 (10 souris)	pCB ureB/IM	lipo-pCB ureB/TN	lipo-pCB ureB/TN
4 (10 souris)	pCB ureB/ID	lipo-pCB ureB/TN	lipo-pCB ureB/TN

5

Aux jours 14, 35 et 56, on prélève des échantillons de sérum chez chacune des souris. La production d'anticorps anti-uréase est recherchée par ELISA (on utilise un extrait soluble purifié d'*H. pylori*).

10

Les résultats présentés en résumé dans la Figure 9 montrent que les différents protocoles d'immunisation permettent d'induire une forte réponse IgG et une moindre réponse IgA.

15

**Exemple 5 : Induction d'une réponse immunitaire mucosale à l'encontre de l'uréase d'*H. pylori*.**

#### 5.A. Préparation de la composition immunisante

20

A 20ml de chloroforme, on ajoute 0.8g de DC-Chol et 2,4g de dioleoylphosphatidycholine (DOPC), dans un ballon de 1 litre. Ce mélange est évaporé sous vide de manière à former un film lipidique sur les parois du ballon. Ce film est ensuite séché sous vide poussé pendant la nuit.

25

Le film est ensuite repris par 400ml d'une solution d'apoenzyme à 1.5mg/ml (préparée comme décrit dans l'Exemple 3.A.) dans du tampon Hepes 20mM pH6.2. On laisse 6 heures à température ambiante sous agitation.

30

La suspension de vésicules multilamellaires qui en résulte, est ensuite microfluidisée par 10 passages à 500kPa dans un microfluidiseur M110S (Microfluidics Co.) pour former une population homogène de liposomes majoritairement unilamellaires d'environ 100nm de diamètre et contenant l'apoenzyme.

5

Ces liposomes sont filtrés à travers un filtre Sténivex-HV (0,45 $\mu$ , Millipore) puis lyophilisés après addition de 20g de sucrose.

10

La taille des liposomes mesurée par light scattering (Zetamaster, Malvern Instruments) est de  $148 \pm 52$ nm. Le taux d'encapsulation de l'apoenzyme est de l'ordre de 20% ; le restant de la quantité totale étant sous forme libre (non-encapsidée).

### 5.B. Protocoles d'immunisation

15

Des souris Swiss âgées de 6 à 8 semaines sont réparties dans 4 groupes (10 souris/groupe) et reçoivent à J0, J28 et J56 par différentes voies, une dose de la préparation obtenue ci-avant.

20

Deux protocoles d'immunisation sont testés. Il s'agit de :

- 1) Sous-cutanée/intragastrique + nasale/intragastrique + nasale ; et
- 2) Intragastrique + nasale, répété 3 fois.

25

Les doses sont comme suit : Pour administration par voie nasale, une quantité de lyophilisat correspondant à 10 $\mu$ g d'apoenzyme totale (encapsidée + non-encapsidée) est reprise extemporanément par 30 $\mu$ l d'eau physiologique (NaCl 9‰). La dose est déposée goutte à goutte sur les narines. Pour administration par voie sous-cutanée, la même dose de lyophilisat est reprise par 300  $\mu$ l de saline. Pour administration par voie intragastrique, une quantité

30 de lyophilisat correspondant à 40 $\mu$ g d'apoenzyme totale (encapsidée + non-encapsidée) est reprise par 300 $\mu$ l de saline complétée par 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>. La dose est administrée à l'aide d'une canule couplée à une seringue de 1 ml.

35

15 jours après la dernière administration, les souris sont éprouvées par gavage intragastrique avec 10<sup>8</sup> germes d'une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris. Un mois après épreuve, les estomacs sont prélevés et un test d'activité urease (Jatrox ND) est effectué sur 1/4 de l'estomac. 4 heures après prélèvement, la densité optique du milieu est mesurée à 550nm. Les résultats sont présentés dans la Figure 10.

40

5            Ces résultats montrent que même si une protection complète n'est pas  
obtenue aux doses de DC-Chol utilisées, une réduction significative de  
l'activité urease, donc de l'infection, est observée par rapport aux contrôles  
positifs (souris ayant reçu des liposomes vides). Ces résultats démontrent aussi  
10 l'intérêt d'une primo-immunisation par voie parentérale ciblée dans la région  
dorso-lombaire (sous-cutanée ; la voie intramusculaire aurait pu être utilisée de  
même et aurait avantageusement permis de cibler plus spécifiquement les  
ganglions coeliaques).

- 36 -

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

- 5 (i) DEPOSANT:  
(A) NOM: Pasteur Merieux Serums & Vaccins  
(B) RUE: 58, avenue Leclerc  
(C) VILLE: Lyon  
10 (E) PAYS: France  
(F) CODE POSTAL: 69007  
(G) TELEPHONE: 72 73 79 31  
(H) TELECOPIE: 72 73 78 50
- 15 (ii) TITRE DE L' INVENTION: Composition destinee a  
l'induction d'une reponse immunitaire mucosale
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4
- 20 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:  
(A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- 25 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 41 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
35 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
- 40 CCCAAATCAT GAAACTCACC CAAAAGAGT TAGATAAGTT G 41

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

- 45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 28 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
50 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
- 55 GCTTCTACAT AGTTAAGCTT AATGCCTT 28

- 37 -

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 36 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

15 CGTCTCGAGC CACCATGAAA AAGATTAGCA GAAAAG 36

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 49 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

ATCGTCCCGG GCAGGCCTCT TAGAAAATGC TAAAGAGTTG CGCCAAGCT 49



### Revendications

1. Une composition pharmaceutique destinée à induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire protectrice à l'encontre d'un antigène, au niveau d'un site mucosal effecteur, qui comprend, pour une administration concomitante ou consécutive : (i) de manière optionnelle, un premier produit et, (ii) au moins un deuxième et un troisième produit ; ces trois produits identiques ou différents, contenant chacun un agent inducteur de la réponse immunitaire sélectionné parmi l'antigène et à condition que l'antigène soit de nature protéique, une cassette d'expression capable d'exprimer l'antigène ; le premier produit étant formulé de manière à être administré par voie systémique, le deuxième produit étant formulé de manière à être administré par voie naso-buccale afin que l'agent inducteur soit ciblé vers le ou les site(s) inducteur(s) d'une réponse immunitaire au niveau du naso-oro-pharynx ou des glandes salivaires, et le troisième produit étant formulé de manière à être administré par une voie mucosale appropriée autre que la voie nasale, afin que l'agent inducteur soit ciblé vers le ou les site(s) inducteur(s) d'une réponse immunitaire au niveau du site effecteur où la réponse immunitaire est recherchée.
2. Une composition selon la revendication 1, dans laquelle le premier produit est formulé de manière à être administré par voie parentérale.
3. Une composition selon la revendication 1 ou 2, pour induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène, au niveau de l'appareil respiratoire (bronches, naso-pharynx, poumons), dans laquelle le troisième produit est formulé pour être administré par voie pulmonaire.
4. Une composition selon la revendication 1 ou 2, pour induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène, au niveau d'un site effecteur mucosal sélectionné parmi le groupe constitué de l'intestin et des muqueuses génitales, dans laquelle le troisième produit est formulé pour être administré par voie uro-génitale.
5. Une composition selon la revendication 1 ou 2, pour induire chez un mammifère hôte, une réponse immunitaire à l'encontre d'un antigène, au niveau de l'estomac ou de l'intestin, dans laquelle le troisième produit est formulé pour être administré par voie orale, y compris la voie intragastrique.

6. Une composition selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle le premier produit contient en outre un adjuvant tel que l'hydroxide ou le phosphate d'aluminium ou par un adjuvant de type ISCOM.
7. Une composition selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle le deuxième produit est formulé sous forme de particules telles que des liposomes ou des microsphères.
8. Une composition selon la revendication 7, dans laquelle le deuxième produit est formulé sous forme de particules ayant un diamètre de 0,05 à 5  $\mu\text{m}$ .
9. Une composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle le troisième produit est formulé sous forme de particules telles que des liposomes ou des microsphères, pour être administré par voie pulmonaire ou par voie orale, y compris la voie intragastrique.
10. Une composition selon la revendication 9, dans laquelle le troisième produit est formulé sous forme de particules ayant un diamètre de 0,05 à 5  $\mu\text{m}$ , pour être administré par voie pulmonaire.
11. Une composition selon la revendication 9, dans laquelle le troisième produit est formulé sous forme de particules ayant un diamètre de 0,05 à 5  $\mu\text{m}$ , pour être administré par voie orale, y compris la voie intragastrique.
12. Une composition selon l'une des revendications 10 à 11, dans laquelle le deuxième ou le troisième produit est un spray ou un aérosol.
13. Une composition selon l'une des revendications 1 à 12, dans laquelle le troisième produit est une préparation entériquement protégée.
14. Une composition selon l'une des revendications 1 à 13, dans laquelle le deuxième ou le troisième produit contient en outre un adjuvant dépourvu de toxicité, autre que les sous-unités non-toxiques ou les formes détoxifiées des toxines bactériennes et autre que des liposomes ou des microsphères.
15. Une composition selon l'une des revendications 1 à 14, dans laquelle le deuxième ou le troisième produit contient en outre du MPLA.

16. Une composition selon l'une des revendications 1 à 15, dans laquelle l'agent inducteur contenu dans le premier, le deuxième ou le troisième produit est l'antigène.
17. Une composition selon l'une des revendications 1 à 16, dans laquelle les agents inducteurs contenus dans le deuxième et troisième produits sont les mêmes.
18. Une composition selon la revendication 17, dans laquelle les agents inducteurs contenus dans le premier, deuxième et troisième produits sont les mêmes.
19. Une composition selon l'une des revendications 2 à 18, dans laquelle le premier produit est formulé pour être administré par voie sous-cutanée, intra-dermique ou intra-musculaire.
20. Une composition selon l'une des revendications 1 à 19, dans laquelle l'antigène est un antigène d'une bactérie pathogène pour le mammifère hôte.
21. Une composition selon les revendications 5 et 20, dans laquelle l'antigène est un antigène d'*Helicobacter pylori*.
22. Une composition selon la revendication 21, dans laquelle l'antigène est la forme apoenzymatique de l'uréase d'*H. pylori*.

Figure 1

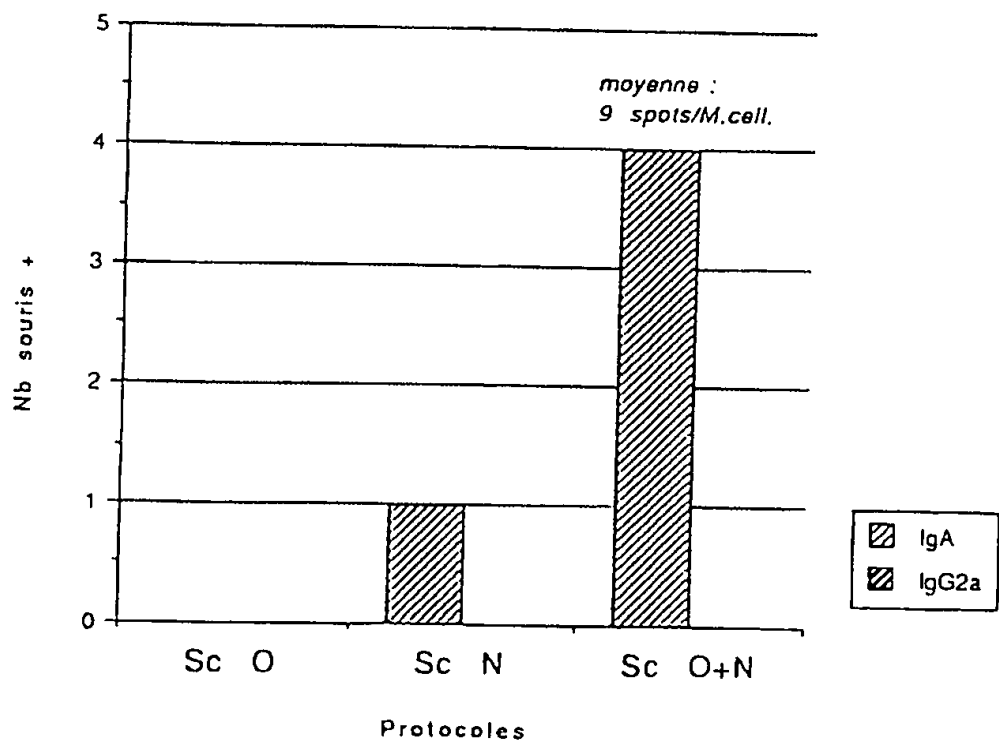
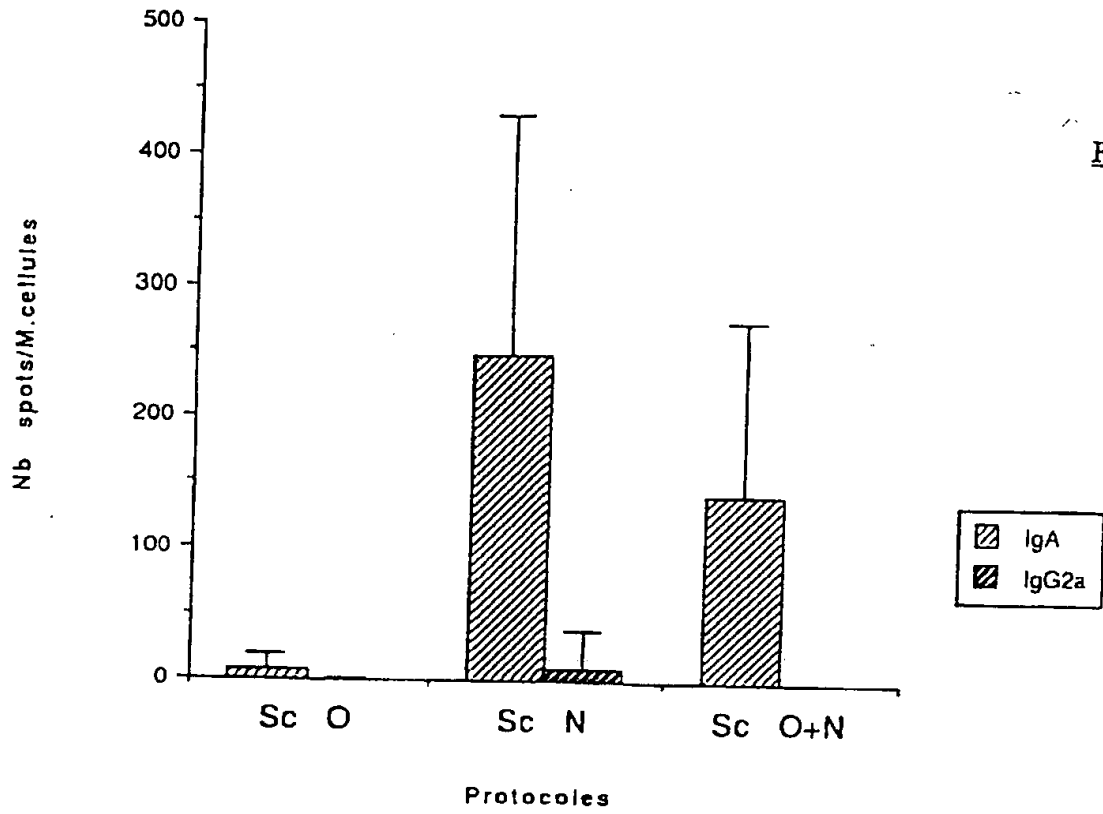


Figure 2

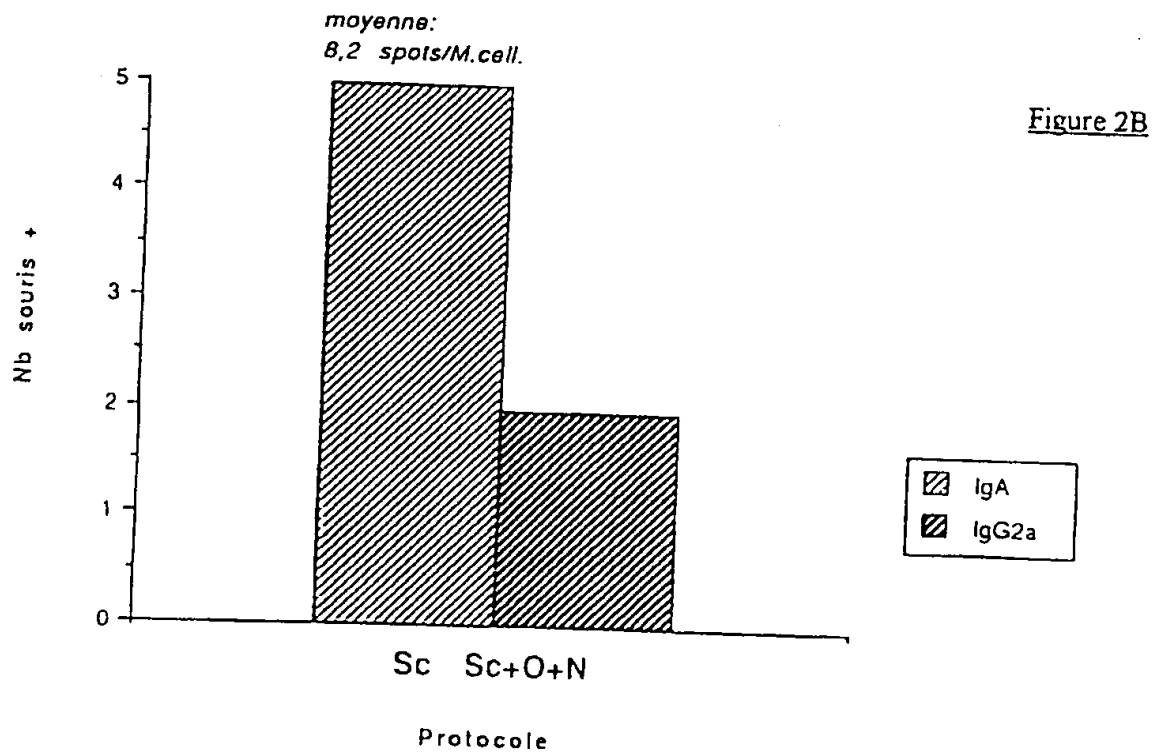
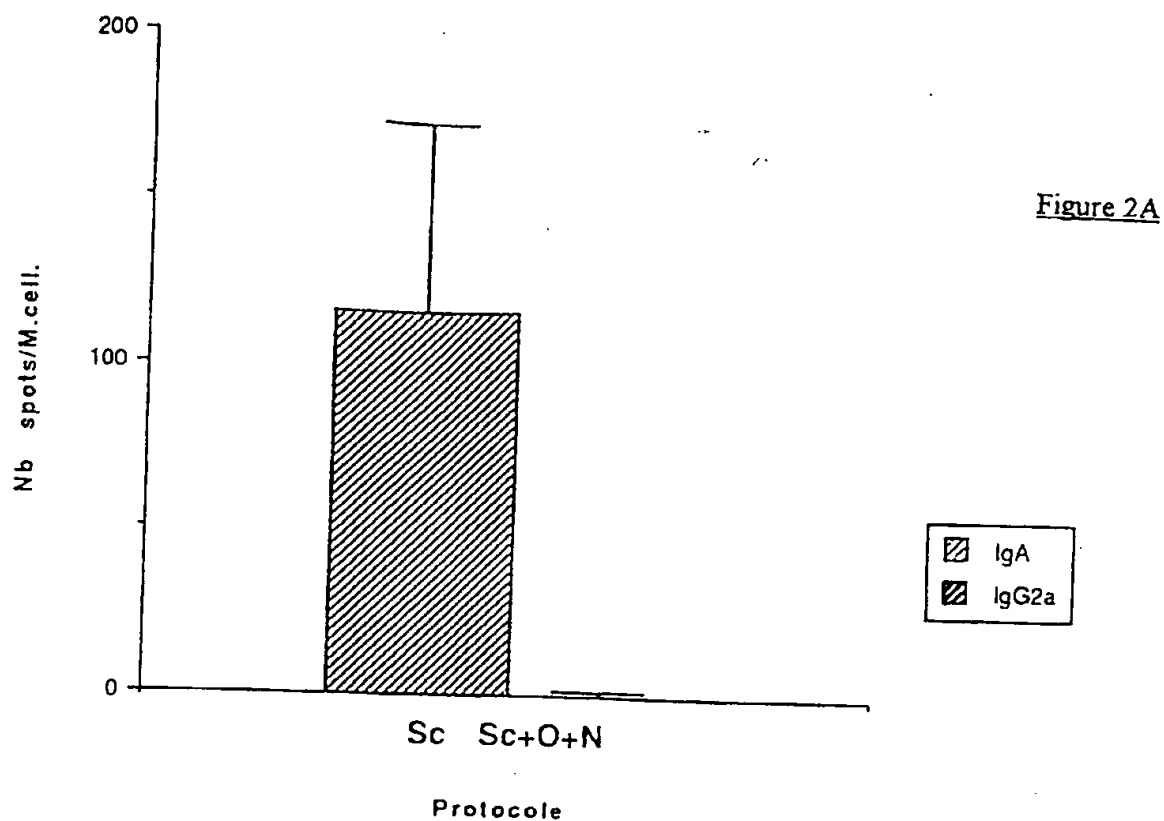


Figure 3

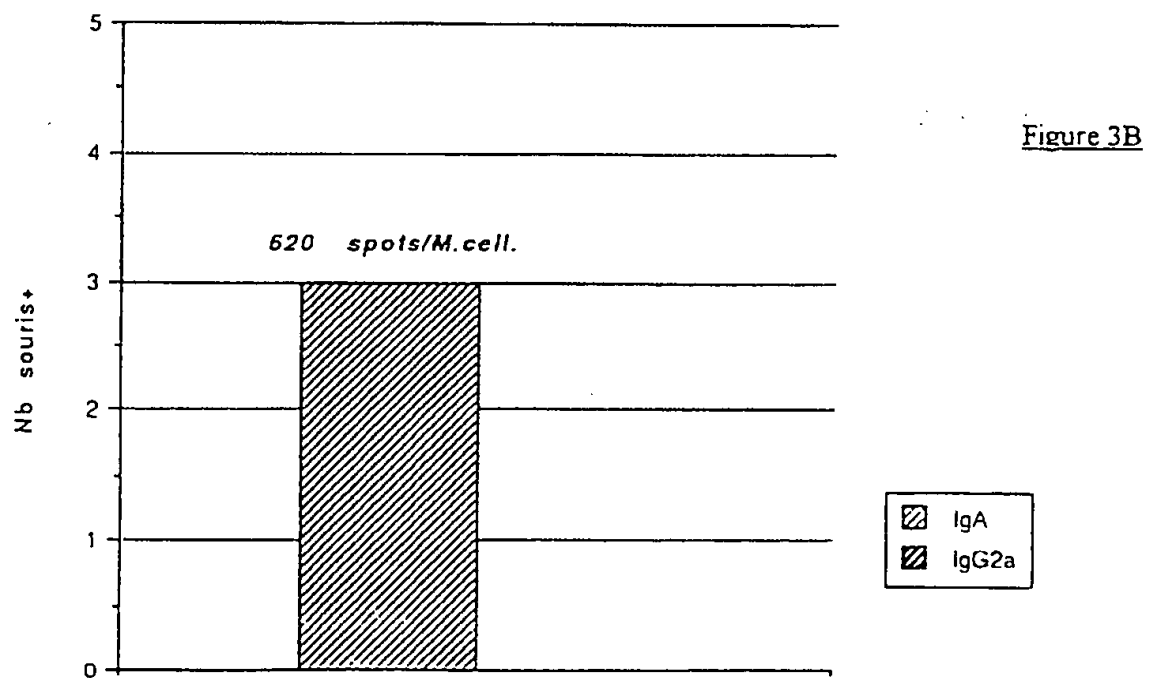
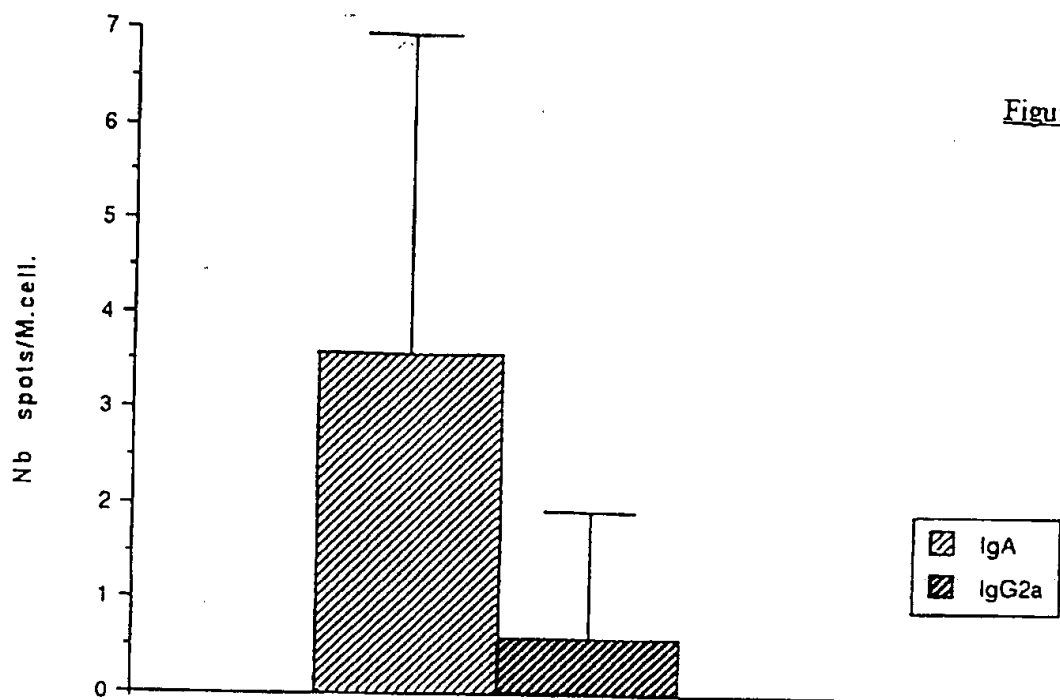


Figure 4

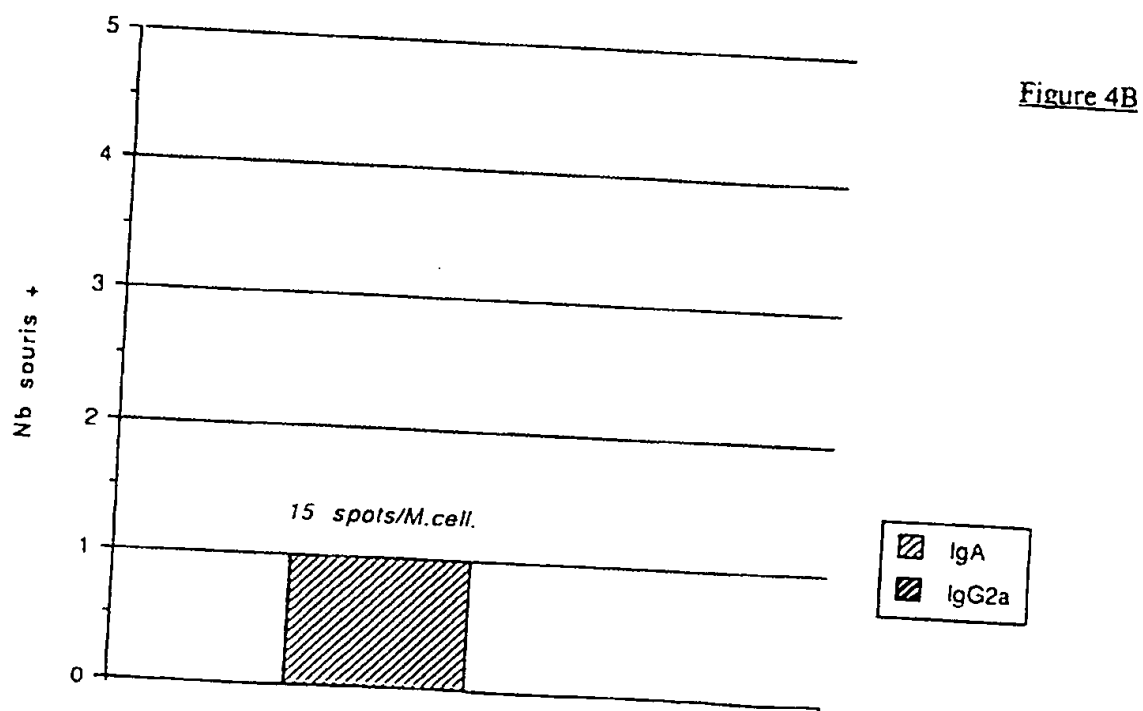
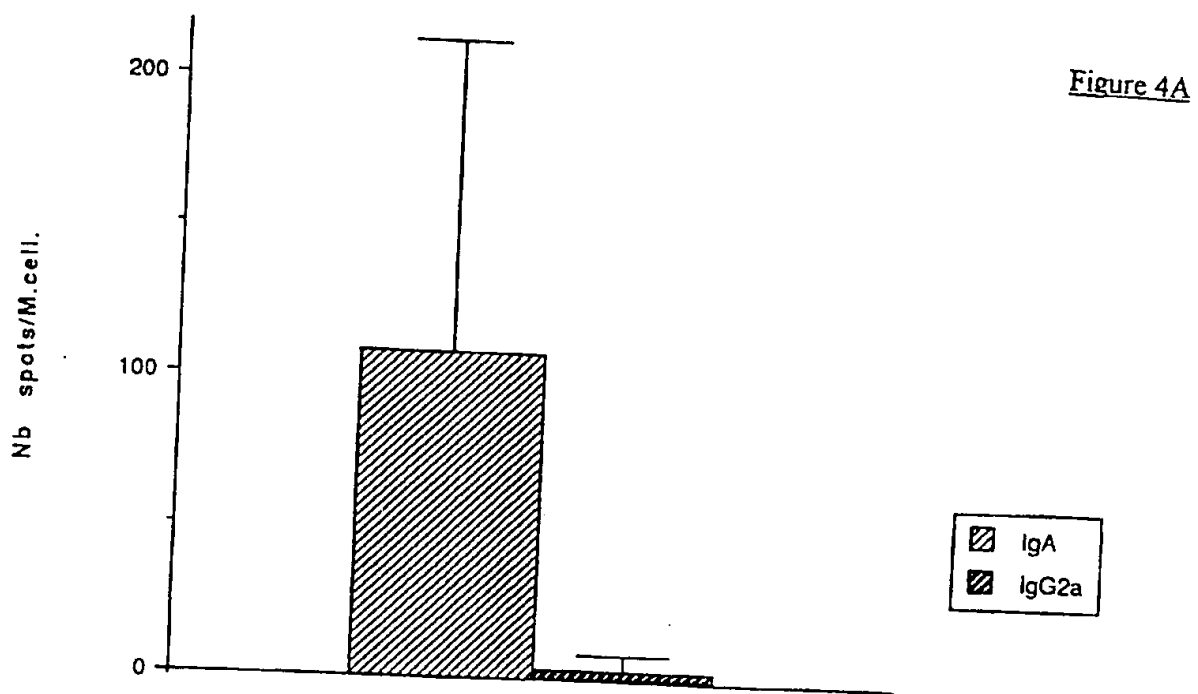


Figure 5

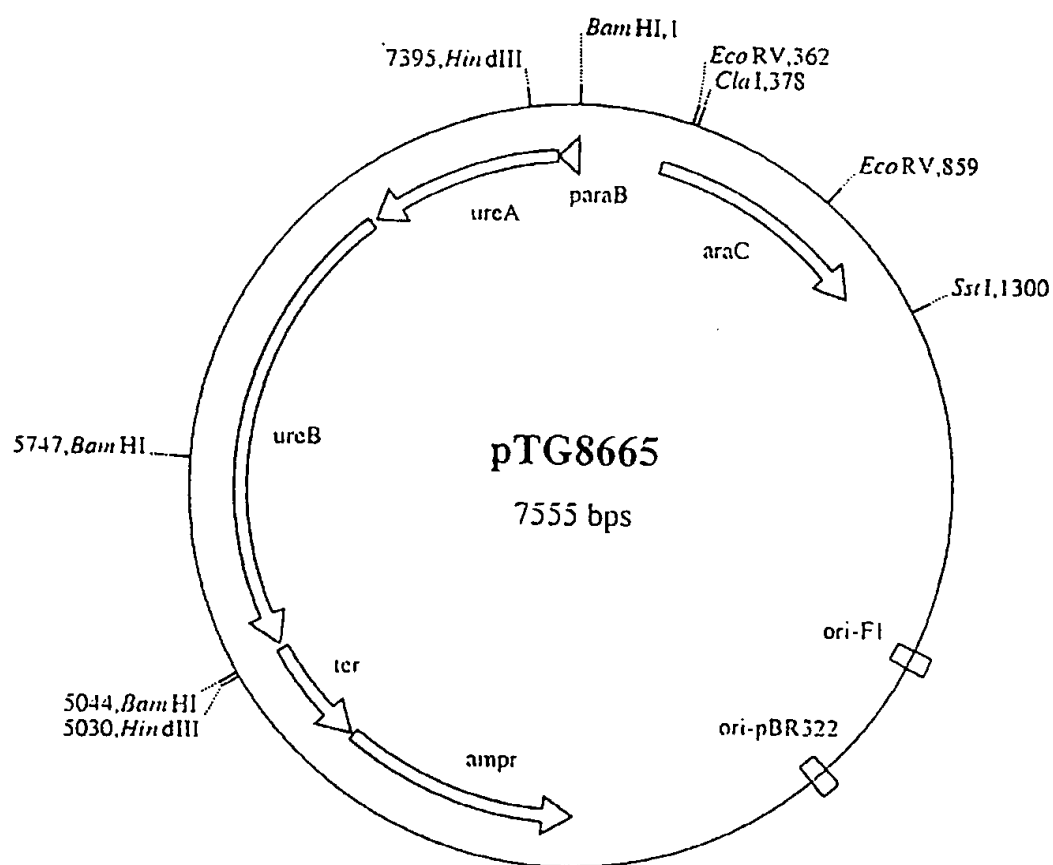




Figure 6

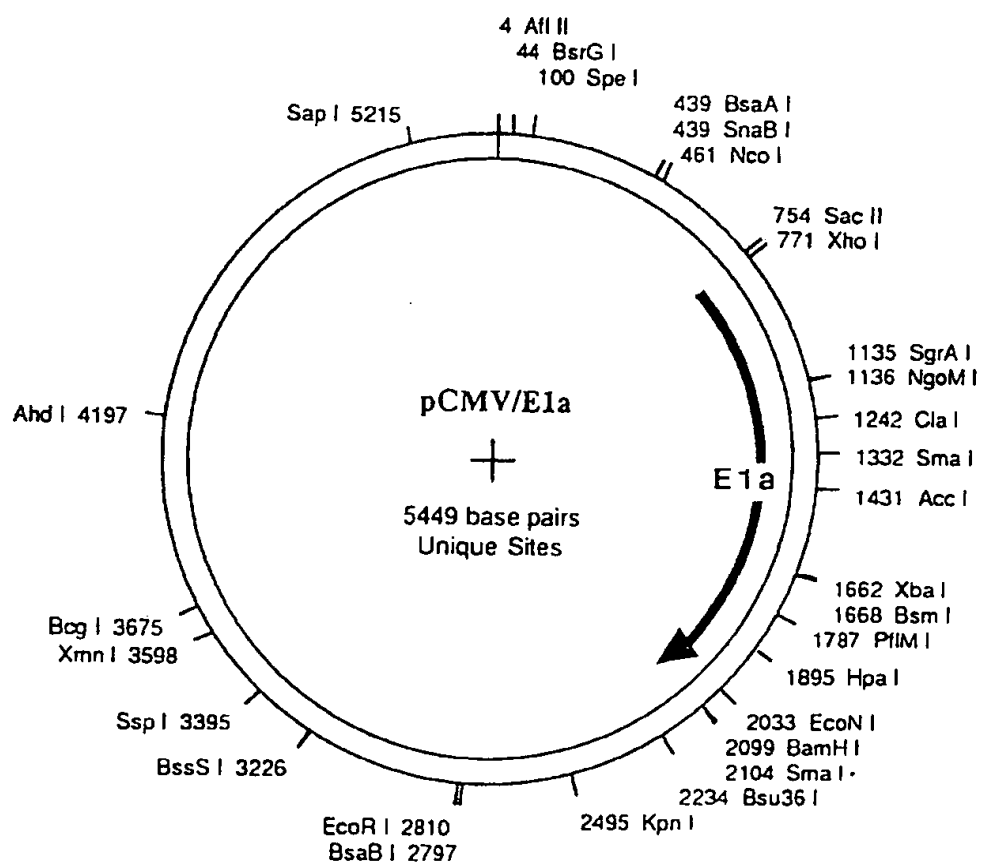


Figure 7

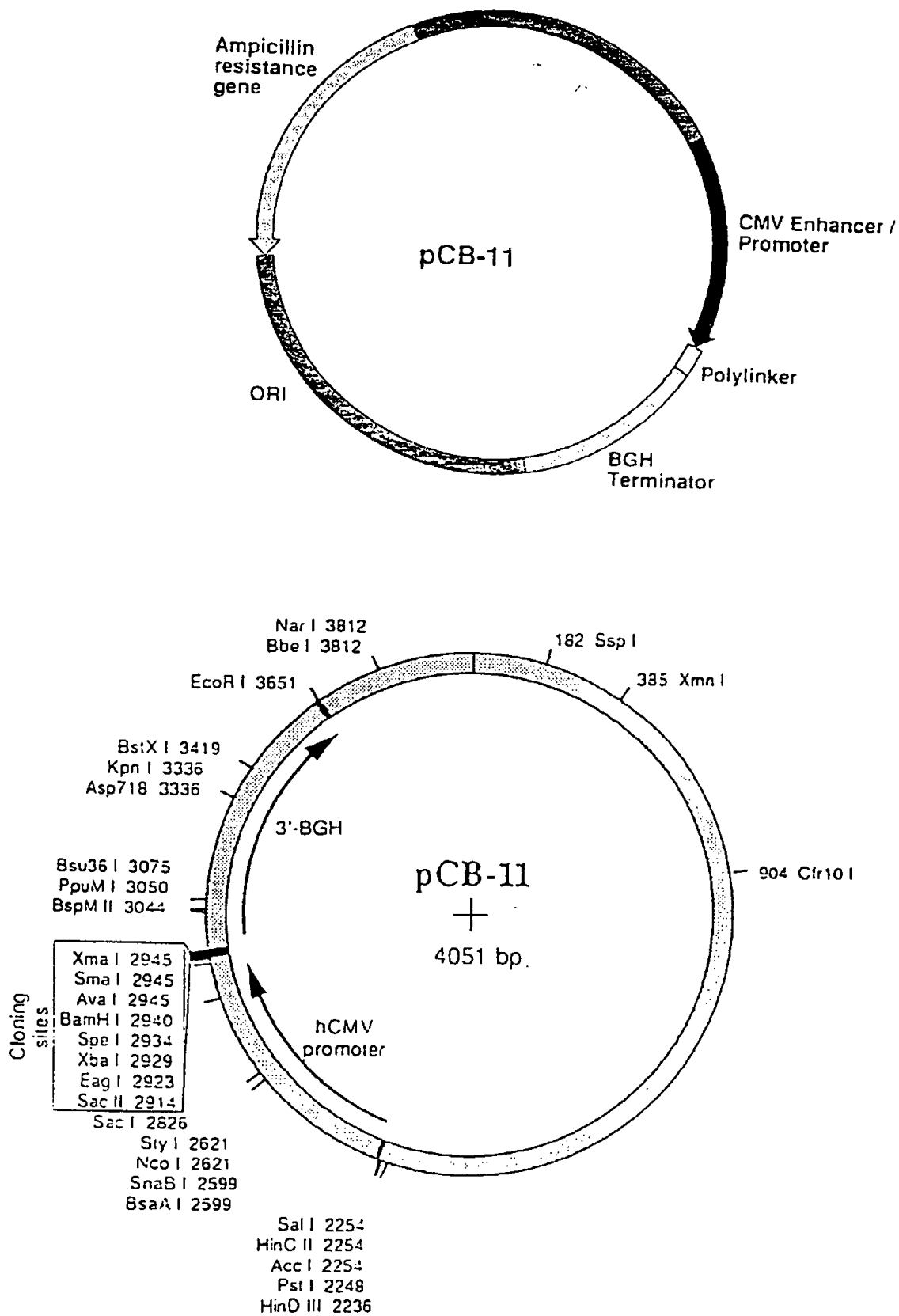


Figure 8

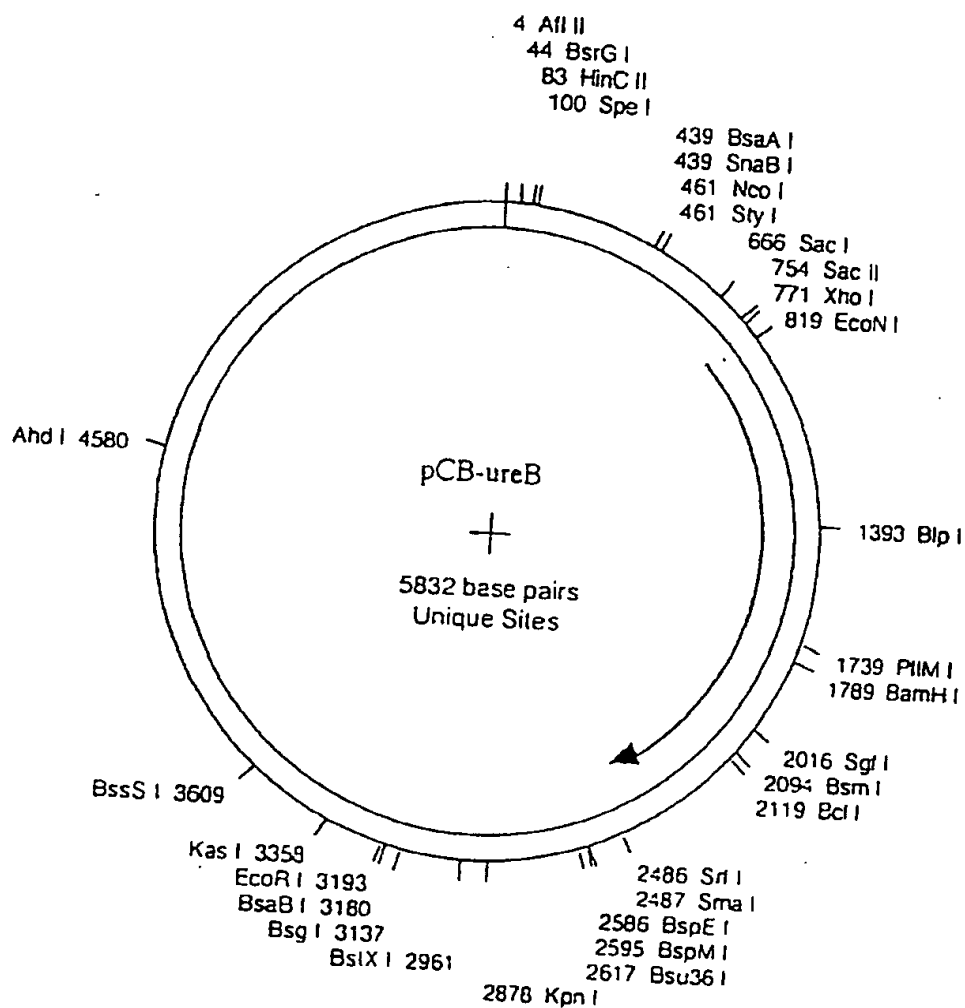


Figure 9

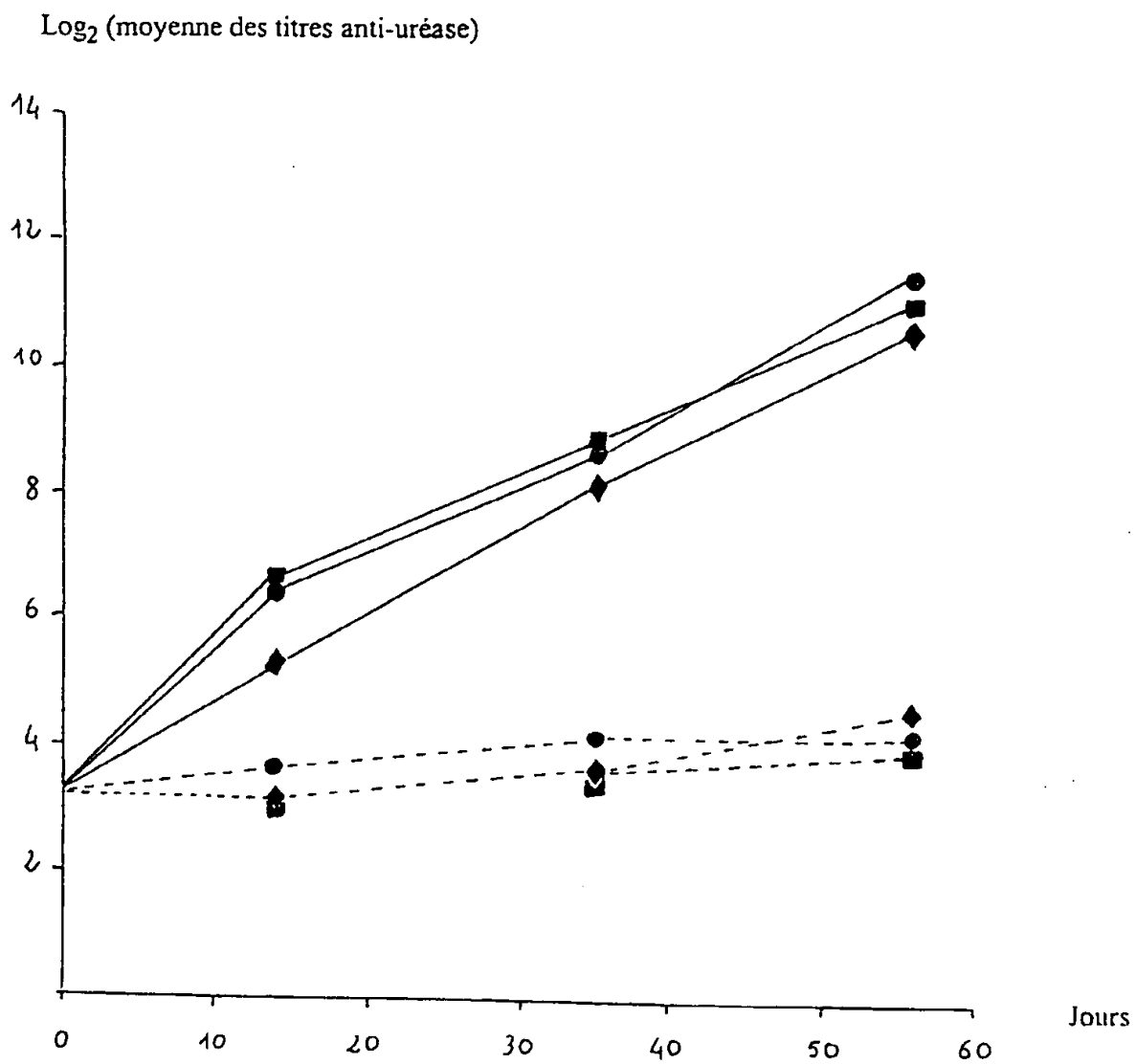
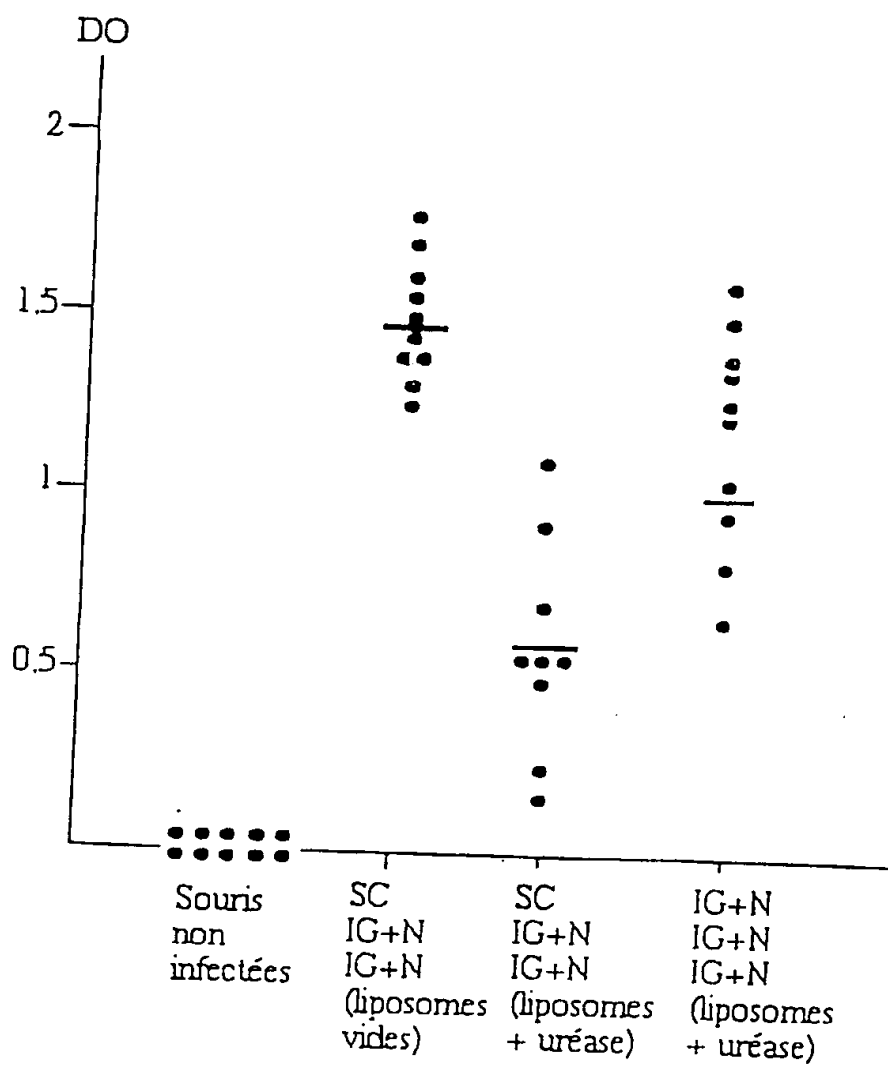


Figure 10



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In .tional Application No

PCT/FR 96/00534

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/106 A61K39/39 //C12N9/80,  
C12N15/57

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 139, no. 10, 15 November 1987, BALTIMORE US, pages 3484-3492, XP002010975 J.G. NEDRUD ET AL.: "COMBINED ORAL/NASAL IMMUNIZATION PROTECTS MICE FROM SENDAI VIRUS INFECTION." cited in the application	1,3,5, 14,16,17
Y	see the whole document	7-13,15, 20-22
Y	--- WO,A,95 03824 (CSL LIMITED ET AL.) 9 February 1995 see page 5, line 1 - line 11; claims see page 5, line 22 - page 6, line 12 --- -/-	7-13,15, 20-22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 1996

Date of mailing of the international search report

04. 09. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/00534

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB,A,2 220 211 (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH INC.) 4 January 1990 see page 8, paragraph 4 - page 11, paragraph 1 see page 15, paragraph 2 ---	15
A	THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 168, no. 3, September 1993, CHICAGO, ILL., US, pages 622-629, XP002010976 W.S. GALLICHAN ET AL.: "MUCOSAL IMMUNITY AND PROTECTION AFTER INTRANASAL IMMUNIZATION WITH RECOMBINANT ADENOVIRUS EXPRESSING HERPES SIMPLEX VIRUS GLYCOPROTEIN B." cited in the application see the whole document ---	1-22
A	VACCINE, vol. 10, no. 2, 1992, GUILDFORD GB, pages 75-88, XP002010977 J.R. MCGHEE: "THE MUCOSAL IMMUNE SYSTEM: FROM FUNDAMENTAL CONCEPTS TO VACCINE DEVELOPMENT." see the whole document -----	1-22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00534

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9503824	09-02-95	AU-B-	7260694	28-02-95
		CA-A-	2154063	09-02-95
		EP-A-	0716613	19-06-96
-----				
GB-A-2220211	04-01-90	US-A-	4912094	27-03-90
		CA-A-	1317589	11-05-93
		DE-A-	3921416	04-01-90
-----				



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde Internationale No  
PCT/FR 96/00534

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/106 A61K39/39 //C12N9/80,  
C12N15/57

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 139, no. 10, 15 Novembre 1987, BALTIMORE US, pages 3484-3492, XP002010975 J.G. NEDRUD ET AL.: "COMBINED ORAL/NASAL IMMUNIZATION PROTECTS MICE FROM SENDAI VIRUS INFECTION." cité dans la demande	1,3,5, 14,16,17
Y	voir le document en entier	7-13,15, 20-22
Y	--- WO,A,95 03824 (CSL LIMITED ET AL.) 9 Février 1995 voir page 5, ligne 1 - ligne 11; revendications voir page 5, ligne 22 - page 6, ligne 12 --- -/-	7-13,15, 20-22

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 Août 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04. 09. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

# ~~R~~APPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D  
nde Internationale No  
PCT/FR 96/00534

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GB,A,2 220 211 (RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH INC.) 4 Janvier 1990 voir page 8, alinéa 4 - page 11, alinéa 1 voir page 15, alinéa 2 ---	15
A	THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, vol. 168, no. 3, Septembre 1993, CHICAGO, ILL., US, pages 622-629, XP002010976 W.S. GALLICHAN ET AL.: "MUCOSAL IMMUNITY AND PROTECTION AFTER INTRANASAL IMMUNIZATION WITH RECOMBINANT ADENOVIRUS EXPRESSING HERPES SIMPLEX VIRUS GLYCOPROTEIN B." cité dans la demande voir le document en entier ---	1-22
A	VACCINE, vol. 10, no. 2, 1992, GUILDFORD GB, pages 75-88, XP002010977 J.R. MCGHEE: "THE MUCOSAL IMMUNE SYSTEM: FROM FUNDAMENTAL CONCEPTS TO VACCINE DEVELOPMENT." voir le document en entier -----	1-22

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

C n° Internationale No  
PCT/FR 96/00534

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9503824	09-02-95	AU-B- 7260694	28-02-95
		CA-A- 2154063	09-02-95
		EP-A- 0716613	19-06-96
-----			
GB-A-2220211	04-01-90	US-A- 4912094	27-03-90
		CA-A- 1317589	11-05-93
		DE-A- 3921416	04-01-90
-----			